環境技術実証モデル事業

化学物質に関する簡易モニタリング技術分野

化学物質に関する簡易モニタリング技術
実証試験結果報告書

環境技術開発者	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
技術・製品の名称	《技術名》ELISA法（酵素免疫測定法） 《製品名》クロロタロニル測定キットE （マイクロプレート）

平成１８年３月

名　古　屋　市

はじめに

環境技術実証モデル事業は、既に適用可能な段階にありながら、環境保全効果等についての客観的な評価が行われていないために普及が進んでいない先進的環境技術について、その環境保全効果等を第三者が客観的に実証する事業をモデル的に実施することにより、環境技術実証の手法・体制の確立を図るとともに、環境技術の普及を促進し、環境保全と環境産業の発展に資することを目的とするものである。

本実証試験は、平成１７年５月１６日　環境省総合環境政策局が策定した実証試験要領（第２版）に基づいて選定された実証対象技術について、同実証試験要領に準拠して実証試験を実施することで、製品性能の信頼性等を客観的に実証するものである。

（実証項目）

- 製品性能の信頼性
- 一般環境モニタリングでの実用性
- 製品操作等の簡便性

本報告書は、その結果を取りまとめたものである。

（実証機関）
名古屋市環境科学研究所
所長　柴田　伸幸

（要　　約）

製品名称	クロロタロニル測定キット E
環境技術開発者	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
実証機関	名古屋市
対象物質	クロロタロニル
実証試験の実施期間	平成 17 年 10 月 24 日～平成 17 年 12 月 16 日

１．実証対象技術の概要

この実証対象製品は、クロロタロニルに対する特異的なモノクローナル抗体を応用した、環境中（対象環境媒体：水質、底質）のクロロタロニル測定 ELISA キットである。
ELISA の原理は、競合反応（クロロタロニル濃度が高い試料では吸光度が低く、クロロタロニル濃度が低い試料では吸光度が高い）で、マイクロプレート（96 ウェル）を使用したキットである。

２．実証試験の概要

実証試験項目の内容は、次のとおりである。

項　　目	内　　容
１．基本的な性能	
(1)測定範囲	市販標準品で調製した指定濃度系列の試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の変動等に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(2)検出下限及び定量下限	市販標準品で調製した指定濃度系列の試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の標準偏差に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(3)繰返し再現性	市販標準品で調製した指定濃度系列の中央付近の試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(4)日間再現性	同一測定者が市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なる条件（日付）での同一操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(5)期間再現性	市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて製造後一定期間経過した製品の操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(6)プレート間再現性	市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なるロットや異なるプレート間での ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(7)交差反応性	市販標準物質及び類似物質を用い調製した指定濃度系列の試験用試料（濃度既知）を用いて類似物質別の ELISA 測定値の相違等に基づき、交差反応性を実証する。

２．実用的な性能	
(1)回収特性	環境試料を模擬し市販標準品で指定濃度範囲の中央付近の１濃度に混合調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の比較に基づき、回収特性を実証する。
(2)測定精度	複数の河川地点から得られた河川水の環境試料（濃度未知）を用いた ELISA 測定値の変動や操作手順・操作方法の特徴等に基づき、測定精度、前処理妥当性、操作簡便性等による環境試料への適用性を実証する。

３．実証対象製品のデータ

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、次のとおりである。

項目	記　入　欄
製品名	クロロタロニル測定キット E
型番	EL108-01
販売・製造元	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
重量（g）	350ｇ
価格（円）	105,000 円
分析対象物質	クロロタロニル
対象環境媒体	(水質)・底質・生物・その他（　　）　底質試料は抽出操作が必要。
利用用途	環境水その他の水質モニタリング
標準試薬・種類	付属（調製済／(調製要)）
操作環境（室温）	室温（15～25℃）
製品保管条件	4～8℃
製品保証期間	製造後 3 ヶ月間
同時測定数（最多）	46 試料
全体測定時間	2～3 時間

４．実証試験結果の概要

項目	結果概要	
実証機関	名古屋市環境科学研究所	
製品名称	クロロタロニル測定キット E	
環境技術開発者	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー	
対象物質	クロロタロニル	
実証試験計画書の策定	平成 17 年 10 月	
実証試験の実施期間	平成 17 年 10 月 24 日～平成 17 年 12 月 16 日	
1）基本的な性能	実験データ	【参考：製品データ】
①測定範囲	調整濃度 0.15～1.5μg/L での 相対値：91～104%、CV：0.6～3.9%	0.15～1.5 μg/L
②検出下限 及び定量下限	調整濃度 0.15 μg/L の SD から求めた 検出下限（3SD）：0.016μg/L 定量下限（10SD）：0.055 μg/L 0 濃度から求めた検出下限：0.011 μg/L	測定下限　0.15 μg/L（検出下限、定量下限のデータなし）
③繰返し再現性	調整濃度 0.5 μg/L での CV：1.4% （SD：0.0068 μg/L）	測定濃度 0.20～1.2 μg/L での CV：5.0～5.4%(きゅうり)
④日間再現性	調整濃度 0.15～1.5 μg/L での CV：6.7～11% （SD：0.010～0.12 μg/L）	測定濃度 0.20～1.2 μg/L での CV：3.6～5.6%（きゅうり）
⑤期間再現性	調整濃度 0.15～1.5 μg/L において１ヶ月を隔てて２回測定した場合の CV ０ヶ月での CV：0.11～1.4% １ヶ月での CV：1.6～7.8%	保存安定性２ヶ月
⑥プレート間再現性	調整濃度 0.15～1.5 μg/L での CV：2.8～9.4% （SD：0.014～0.044 μg/L）	記述なし
⑦交差反応性	交差反応率： フサライド(31%) PCP(0.12%)	交差反応率： フサライド(38.7%) PCP(1.7%)
⑧その他		
2）実用的な性能		
①回収特性	回収率 114～205% （試料：河川水、調整濃度 0.5μg/L、妨害物質：フミン酸ナトリウム 0～50mg/L）	回収率 94.1～109.4%（検体：きゅうり）
②測定精度等	３地点の河川水について ELISA 法、GC/MS 法とも検出されず ＜クロロタロニル添加試験＞ 河川水にクロロタロニル 0.17μg/L 添加 ELISA 法：回収率 107～123%、CV：1.0～5.6% GC/MS 法：回収率 111～115%、CV：3.0～7.8%	記述なし
③その他		

結果の検討と考察

1） 製品性能の信頼性

実証試験で実施した基本性能７項目の全てについて、申請データ(0.15～1.5μg/L)の濃度範囲において十分な信頼性が確認された。

2） 一般環境モニタリングでの実用性

河川水を用いた添加回収試験の結果から、妨害物質（フミン酸ナトリウム）による正の妨害は認められたものの、検出感度及び測定精度とも実用に耐えうると考えられた。今後、マトリックスの異なる環境試料に対するデータを蓄積することにより、環境モニタリングへの実用化が可能と考えられた。

3） 製品操作等の簡便性

一般環境モニタリングでの使用を想定した場合、測定結果が得られるまで約２～３時間で、同時に最大２６試料（３重測定）の測定が可能となる。なお、本試験での GC/MS－SIM 法では、３試料（３重測定）の測定に約３日が必要であった。

取扱説明書については、わかりやすく説明してあり、特に問題はないと考えられる。

（本　　編）

目　次

1.実証試験の概要 …… 1
1.1 実証対象製品のデータ …… 1
1.2 実証試験結果 …… 2
(1)基本的な性能 …… 2
(2)実用的な性能 …… 3
2.実証対象技術及び実証対象製品の特性と説明 …… 4
2.1 実証申請者 …… 4
2.2 実証対象技術の原理 …… 4
2.3 実証対象製品のデータ（性能、製品製造者、製品番号等） …… 4
3.実証試験実施体制 …… 5
3.1 実証試験申請者 …… 5
3.2 実証試験実施者 …… 5
3.3 実証試験実施場所 …… 5
(1)ＥＬＩＳＡ法 …… 5
(2)機器分析法 …… 5
3.4 実証試験実施期間 …… 5
4. 試験方法 …… 6
4.1 共通して行う試験操作 …… 6
(1)製品の操作 …… 6
(2)検量線作成用標準溶液の調製 …… 6
(3)吸光度の測定 …… 6
(4)検量線の作成 …… 6
(5)実測濃度の算出 …… 6
4.2 基本的な性能 …… 7
(1)測定範囲 …… 7
(2)検出下限及び定量下限 …… 8
(3)繰返し再現性 …… 9
(4)日間再現性 …… 10
(5)期間再現性 …… 11
(6)プレート間再現性 …… 12
(7)交差反応性 …… 13
4.3 実用的な性能 …… 14
(1)回収特性 …… 14
(2)測定精度等 …… 15
5.試験結果 …… 16
5.1 基本的な性能 …… 16
(1)測定範囲 …… 16

(2)検出下限及び定量下限 ····· 17
(3)繰返し再現性 ····· 19
(4)日間再現性 ····· 20
(5)期間再現性 ····· 24
(6)プレート間再現性 ····· 26
(7)交差反応性 ····· 30
5.2 実用的な性能 ····· 33
(1)回収特性 ····· 33
(2)測定精度等 ····· 34
6.実証試験結果の検討と考察 ····· 37
(1)製品性能の信頼 ····· 37
(2)一般環境モニタリングでの実用性 ····· 37
(3)製品操作等の簡便性 ····· 37

付録　： 実証試験計画書

1．実証試験の概要

1.1 実証対象製品のデータ

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、下表に示すとおりである。

表 1.1.1 実証対象製品のデータ

項目	記　入　欄
製品名	クロロタロニル測定キット E
実証申請者	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー　代表取締役社長　河野　猛
実証試験実施者	名古屋市環境科学研究所　所長　柴田　伸幸
実証試験実施場所	〒457-0841　名古屋市南区豊田五丁目 16-8 名古屋市環境科学研究所
実証試験実施期間	平成 17 年 10 月 24 日～平成 17 年 12 月 16 日
製品名	クロロタロニル測定キット E
型番	EL108-01
販売・製造元	株式会社ホリバ・バイオテクノロジー
重量（g）	350ｇ
価格（円）	105,000 円
分析対象物質	クロロタロニル
対象環境媒体	(水質)・底質・生物・その他（　　）　底質試料は抽出操作が必要。
利用用途	環境水その他の水質モニタリング
標準試薬・種類	付属（調製済／(調製要)）
操作環境（室温）	室温（15～25℃）
製品保管条件	4～8℃
製品保証期間	製造後 3 ヶ月間
同時測定数（最多）	46 試料
全体測定時間	2～3 時間

1.2 実証試験結果

環境技術開発者が実証申請書に示した基本的な性能に関するデータと実証試験結果はよく一致し、申請通りの基本性能を有していることを確認した。実用的な性能についても、回収特性及び測定精度とも問題なかった。

(1) 基本的な性能

① 測定範囲

申請データ：0.15～1.5μg/L

実証データ：0.15～1.5μg/L

（変動係数 0.60～3.9%、相対値 91～104%）

② 検出下限及び定量下限

申請データ：測定下限 0.15μg/L（検出下限、定量下限のデータなし）

実証データ：測定濃度 0.15μg/L の SD より求めた検出下限（検出下限１）

0.016μg/L、定量下限 0.055μg/L

0 濃度の SD より求めた検出下限（検出下限２）0.011μg/L

検出下限 1：指定濃度系列下限付近の濃度についての 8 回繰り返し測定で得られた測定濃度の標準偏差（SD）より、3 倍の値（3SD）として得られた値。定量下限はこの標準偏差の 10 倍の値（10SD）。

検出下限 2：指定濃度系列 0 濃度についての 10 回繰り返し測定で得られた吸光度の標準偏差（SD）の 3SD 値を、0 濃度の吸光度から差し引いた吸光度より、検量線で換算された値。

③ 繰返し再現性

申請データ：測定濃度 0.20、0.59、1.2μg/L における変動係数 5.0～5.4%

実証データ：測定濃度 0.50μg/L における変動係数 1.4%

④ 日間再現性

申請データ：測定濃度 0.20、0.59、1.2μg/L における変動係数 3.6～5.6%

実証データ：測定濃度 0.15～1.5μg/L における変動係数 6.7～11%

⑤ 期間再現性

申請データ：保存安定性２ヶ月

実証データ：約１ヶ月間冷蔵庫内で密閉保存した同一ロットの２キットに対し、

測定濃度 0.15～1.5μg/L において

0 ヶ月の CV：0.11～1.4%

1 ヶ月後の CV：1.6～7.8%

⑥ プレート間再現性

申請データ：記述なし

実証データ：測定濃度 0.15～1.5μg/L における変動係数 2.8～9.4%

⑦ 交差反応性

申請データ：フサライド 38.7%、PCP1.7%

実証データ：フサライド 31%、PCP0.12%

(2) 実用的な性能

① 回収特性

申請データ：回収率 94.0～109.4%（妨害物質：きゅうり）

実証データ：回収率 114～205%（妨害物質：フミン酸ナトリウム）

回収率 205%はフミン酸ナトリウム 50mg/L 添加したときの回収率

② 測定精度等

申請データ：記述なし

実証データ：実試料（河川水）３試料について、ガラス繊維ろ紙でろ過したもの（ろ液）を ELISA 法で、未処理のものを GC/MS 法で、それぞれ３回測定したところ、ELISA 法では全て定量下限（0.055μg/L）未満であり、GC/MS 法では全て MDL（0.0069μg/L）未満であった。一方、実試料（河川水）３試料にクロロタロニル標準品を添加し、クロロタロニル濃度を 0.17μg/L とした試料を測定した。ELISA 法では回収率 107～123%で、測定値の変動係数は 1.0～5.6%であった。また、GC/MS 法では回収率 111～115%で、測定値の変動係数は 3.0～7.8%であった。

2．実証対象技術及び実証対象製品の特性と説明

2.1 実証申請者

企　業　名：株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
担当者所属・氏名：試薬事業部　開発・製造部　伊東　茂壽
住　　所　：〒601-8315　京都市南区吉祥院車道町 48 番地
電話番号　：075-692-1786
ＦＡＸ番号：075-692-1790
e-mail アドレス：Shigekazu.ito@horiba.com

2.2 実証対象技術の原理

この実証対象製品は、申請者が開発したクロロタロニルに対する特異的なモノクローナル抗体を応用した、環境中（対象環境媒体：水質、底質、生物、その他）のクロロタロニル測定 ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応（クロロタロニル濃度が高い試料では吸光度が低く、クロロタロニル濃度が低い試料では吸光度が高い）で、マイクロプレート（96 ウエル）を使用したキットである。

2.3 実証対象製品のデータ（性能、製品製造者、製品番号等）

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、下表に示すとおりである。

表 2.3.1　実証対象製品のデータ

項目	記　入　欄
製品名	クロロタロニル測定キットＥ
型番	ＥＬ108-01
販売・製造元	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
重量（g）	350g
価格（円）	105,000 円
分析対象物質	クロロタロニル
対象環境媒体	(水質)・底質・生物・その他（　　）
利用用途	環境水その他の水質モニタリング
標準試薬・種類	付属（調製済／(調製要)）
操作環境（室温）	室温（１５～２５℃）
製品保管条件	４～８℃
製品保証期間	製造後３ヶ間
同時測定数（最多）	４６試料
測定時間	２～３時間

3.実証試験実施体制

3.1 実証試験申請者

実施責任者：名古屋市環境局公害対策課長　加藤　明
所属部署　：環境局公害対策課有害化学物質対策係
担当者氏名：中村清志
住　　所　：〒460-0001　愛知県名古屋市中区三の丸三丁目１番１号
電話番号　：052-972-2677
ＦＡＸ番号：052-972-4155
e-mail アドレス：a2677@kankyokyoku.city.nagoya.lg.jp

3.2 実証試験実施者

実施責任者：名古屋市環境科学研究所　所長　柴田伸幸
実証試験担当者氏名：(ELISA 法)　大気騒音部　研究員　中島寛則
（機器分析法）水質部　主任研究員　小島節子
連絡窓口：水質部　主任研究員　小島節子
住　　所　：〒457-0841 名古屋市南区豊田 5 丁目 16-8
電話番号　：052-692-8481
ＦＡＸ番号：052-692-8483
e-mail アドレス：kojima@nagoyakankaken.office.to

3.3 実証試験実施場所

(1) ＥＬＩＳＡ法

名古屋市環境科学研究所

(2) 機器分析法

名古屋市環境科学研究所

3.4 実証試験実施期間

平成１７年１０月２５日～１２月１６日

4.試験方法

4.1 共通して行う試験操作

「4.2 基本的な性能」及び「4.3 実用的な性能」において、以下の方法は共通である。

(1) 製品の操作

製品の操作にあたっては、製品の取扱説明書を遵守するとともに、ＥＬＩＳＡに係わる品質管理システムの試験操作手順（一般的な事項）に従って行った。

(2) 検量線作成用標準溶液の調製

製品の取扱説明書に記載の方法により、検量線用標準溶液の希釈系列を調製した。

(3) 吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（Labsystems 社製 Multiscan MS）で測定し、検量線作成用標準溶液及び各試験用試料溶液の吸光度とした。

(4) 検量線の作成

プレート毎に同時に測定したゼロブランク（ＢＬＫ：添付の希釈液等）及び検量線作成用標準溶液の吸光度（３重測定の平均値）から取扱説明書に従って検量線（取扱説明書の指示：４パラメーターによりロジスティック曲線を近似した標準曲線）を作成した。

(5) 実測濃度の算出

「(4)検量線の作成」で作成した検量線を用いて、各試験用試料溶液の吸光度から各実測濃度を算出した。

4.2 基本的な性能

(1) 測定範囲

① 試験条件

本製品の測定範囲における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.1 測定範囲の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・測定範囲(標準試料試験)
対象物質	クロロタロニル
対象製品名	クロロタロニル測定キット E （マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：E-TPN001F
製造年月日	平成 17 年 9 月 29 日
測定範囲（製品仕様）	0.15～1.5μg/L
試験日時	平成 17 年 10 月 25 日　9：00　～　17：00
試験場所	名古屋市環境科学研究所
試験時室内温度	25℃±1℃
使用した市販標準品	物質名：クロロタロニル　試薬会社名：和光純薬工業 製品番号：200-06581　ロット番号：HSN9342
検量線用ソフト名	GENESIS-LITE（Labsystems 社製）
試験機関・担当者	名古屋市環境科学研究所大気騒音部　研究員　中島寛則

② 試験操作

クロロタロニルを用い、10%メタノール溶液を希釈溶媒として、試験用試料溶液（0, 0.15, 0.30, 0.60, 1.5μg/L）を調製した。調製した試験用試料溶液を用いて、各調製濃度につき 3 重測定を行い、3 個の吸光度それぞれから求めた測定濃度より、平均値、標準偏差、変動係数を求めた。

(2) 検出下限及び定量下限

① 試験条件

本製品の検出下限及び定量下限における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.2 検出下限及び定量下限の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・検出下限及び定量下限(標準試料試験)
対象物質	クロロタロニル
対象製品名	クロロタロニル測定キット E （マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：E-TPN001F
製造年月日	平成 17 年 9 月 29 日
測定範囲（製品仕様）	0.15～1.5μg/L
試験日時	平成 17 年 10 月 25 日　9：00　～　17：00
試験場所	名古屋市環境科学研究所
試験時室内温度	25℃±1℃
使用した市販標準品	物質名：クロロタロニル　試薬会社名：和光純薬工業 製品番号：200-06581　ロット番号：HSN9342
検量線用ソフト名	GENESIS-LITE（Labsystems 社製）
試験機関・担当者	名古屋市環境科学研究所大気騒音部　研究員　中島寛則

② 試験操作

クロロタロニルを用い、10％メタノール溶液を希釈溶媒として、試験用試料溶液（0.15μg/L：測定範囲の下限付近濃度）を調製した。調製した試験用試料溶液を 3 重測定で 8 回測定し、3 重測定の平均吸光度から算出した 8 個の測定濃度より標準偏差（SD）を求めた。求めた SD から得られた 3SD 及び 10SD をそれぞれ検出下限 1 及び定量下限とした。

これとは別に、指定濃度系列 0 濃度の吸光度を 10 回測定し、その標準偏差から得られる 3SD 値（吸光度）を 0 濃度の吸光度から差し引いた吸光度より、検量線を用いて換算濃度を求め、この濃度を検出下限 2 とした。

(3) 繰返し再現性

① 試験条件

本製品の繰返し再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.3 繰返し再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・繰返し再現性(標準試料試験)
対象物質	クロロタロニル
対象製品名	クロロタロニル測定キット E （マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：E-TPN001F
製造年月日	平成 17 年 9 月 29 日
測定範囲（製品仕様）	0.15～1.5μg/L
試験日時	平成 17 年 10 月 26 日　9：00　～　17：00
試験場所	名古屋市環境科学研究所
試験時室内温度	20℃±1℃
使用した市販標準品	物質名：クロロタロニル　試薬会社名：和光純薬工業 製品番号：200-06581　ロット番号：HSN9342
検量線用ソフト名	GENESIS-LITE（Labsystems 社製）
試験機関・担当者	名古屋市環境科学研究所大気騒音部　研究員　中島寛則

② 試験操作

クロロタロニルを用い、10％メタノール溶液を希釈溶媒として、試験用試料溶液（0.5μg/L：測定範囲の直線付近濃度）を調製した。調製した試験用試料溶液を 3 重測定で 8 回測定し、得られた 8 個の実測濃度より平均値、標準偏差、変動係数を求めた。求めた変動係数から、繰り返し再現性について検討した。

(4) 日間再現性

① 試験条件

本製品の日間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.4 日間再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・日間再現性(標準試料試験)
対象物質	クロロタロニル
対象製品名	クロロタロニル測定キット E （マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：E-TPN001F
製造年月日	平成 17 年 9 月 29 日
測定範囲（製品仕様）	0.15～1.5μg/L
試験日時	平成 17 年 10 月 25 日　9：00　～　17：00 平成 17 年 10 月 26 日　9：00　～　17：00 平成 17 年 10 月 28 日　9：00　～　17：00
試験場所	名古屋市環境科学研究所
試験時室内温度	23℃±3℃
使用した市販標準品	物質名：クロロタロニル　試薬会社名：和光純薬工業 製品番号：200-06581　ロット番号：HSN9342
検量線用ソフト名	GENESIS-LITE（Labsystems 社製）
試験機関・担当者	名古屋市環境科学研究所大気騒音部　研究員　中島寛則

② 試験操作

同一測定者が 1 週間の異なる 3 日間において、同一ロットの異なるプレートを用いて、「（1）測定範囲」と同じ測定操作を行った。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、3 日間の比較から日間再現性について検討した。

(5) 期間再現性

① 試験条件

本製品の期間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.5 期間再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・期間再現性(標準試料試験)
対象物質	クロロタロニル
対象製品名	クロロタロニル測定キット E （マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：E-TPN001F
製造年月日	平成 17 年 9 月 29 日
測定範囲（製品仕様）	0.15～1.5μg/L
試験日時	平成 17 年 10 月 28 日　9：00　～　17：00 平成 17 年 12 月 5 日　13：00　～　19：00
試験場所	名古屋市環境科学研究所
試験時室内温度	20℃±2℃
使用した市販標準品	物質名：クロロタロニル　試薬会社名：和光純薬工業 製品番号：200-06581　ロット番号：HSN9342
検量線用ソフト名	GENESIS-LITE（Labsystems 社製）
試験機関・担当者	名古屋市環境科学研究所大気騒音部　研究員　中島寛則

② 試験操作

概ね１ヶ月ほどの間隔をおいて、同一ロットの異なるプレートを用いて、「（１）測定範囲」と同じ測定操作を行った。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、両者の比較から期間再現性について検討した。

(6) プレート間再現性

① 試験条件

本製品のプレート間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.6 プレート間再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・プレート間再現性(標準試料試験)
対象物質	クロロタロニル
対象製品名	クロロタロニル測定キット E （マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：E-TPN001F, E-TPN002F
製造年月日	平成 17 年 9 月 29 日（E-TPN001F）、平成 17 年 8 月 30 日（E-TPN002F）
測定範囲（製品仕様）	0.15～1.5μg/L
試験日時	平成 17 年 10 月 28 日　9：00　～　17：00
試験場所	名古屋市環境科学研究所
試験時室内温度	20℃±1℃
使用した市販標準品	物質名：クロロタロニル　試薬会社名：和光純薬工業 製品番号：200-06581　ロット番号：HSN9342
検量線用ソフト名	GENESIS-LITE（Labsystems 社製）
試験機関・担当者	名古屋市環境科学研究所大気騒音部　研究員　中島寛則

② 試験操作

同一ロット 2 プレート及び異なるロット 1 プレートの 3 プレートを用いて、同日に「（1）測定範囲」と同じ測定操作を行った。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、同一ロット及び異なるロットの比較からプレート間再現性について検討した。

(7) 交差反応性

① 試験条件

本製品の交差反応性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.7 交差反応性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・交差反応性(標準試料試験)
対象物質	クロロタロニル
対象製品名	クロロタロニル測定キット E （マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：E-TPN001F
製造年月日	平成 17 年 9 月 29 日
測定範囲（製品仕様）	0.15～1.5μg/L
試験日時	平成 17 年 10 月 31 日　9：00　～　17：00
試験場所	名古屋市環境科学研究所
試験時室内温度	21℃±1℃
検量線用ソフト名	GENESIS-LITE（Labsystems 社製）
試験機関・担当者	名古屋市環境科学研究所大気騒音部　研究員　中島寛則

表4.2.8 使用した市販標準品

物質名（標準品）		試薬会社名	規格	含量	製品番号	ロット番号
対象物質	クロロタロニル	和光純薬工業	残留農薬試験用	99.0% (minimum)	200-06581	HSN9342
類似物質	フサライド	和光純薬工業	残留農薬試験用	99.0% (minimum)	063-01593	YPP9644
	PCP	和光純薬工業	残留農薬試験用	99.0% (minimun)	161-08301	YPK9651

② 試験操作

クロロタロニル、フサライド及び PCP について調製した試料溶液で吸光度曲線（実測値は 3 重測定の平均値から求めた）を描き、吸光度曲線から類似物質の 50%発色阻害濃度を求めた。（クロロタロニルの 50%発色阻害濃度／フサライド又は PCP の 50%発色阻害濃度）×100（%）で交差率を求めた。

4.3 実用的な性能

(1) 回収特性

① 試験条件

本製品の回収特性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.1 回収特性の試験条件

項目	内容
実証項目	実用的な性能・回収特性(模擬環境試料試験)
対象物質	クロロタロニル
対象製品名	クロロタロニル測定キット E （マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：E-TPN001F
製造年月日	平成 17 年 9 月 29 日
測定範囲（製品仕様）	0.15～1.5μg/L
試験日時	平成 17 年 11 月 9 日　9：00　～　14：00
試験場所	名古屋市環境科学研究所
試験時室内温度	20℃±1℃
使用した市販標準品	物質名：クロロタロニル　試薬会社名：和光純薬工業 製品番号：200-06581　ロット番号：HSN9342
使用した妨害物質名	物質名：フミン酸ナトリウム（フミン酸として 50-60%含有） 試薬会社名：アクロス社 製品番号：120860050　ロット番号：A0207160001
検量線用ソフト名	GENESIS-LITE（Labsystems 社製）
試験機関・担当者	名古屋市環境科学研究所大気騒音部　研究員　中島寛則

表 4.3.2 使用した河川水

試料番号	地点名	採水日	採水量	備考
S1	矢田川大森橋	平成 17 年 10 月 20 日	3L×１本	PH6.8　COD9.8mg/L Cl^-27mg/L

② 試験操作

グラスファイバーフィルター（GFC：孔径 1.2μm）を用いて、河川水をろ過したろ液を原水とし、原水を 10%メタノール溶液とした後、測定範囲の中央付近となるようにクロロタロニルを添加（0.50μg/L）するとともに　、妨害物質としてフミン酸ナトリウムを添加（0，1，5，10，50 mg/L）して、試験用試料溶液を調製した。

調製した試験用試料溶液について、3 重測定した実測濃度から回収率を求め、フミン酸ナトリウムに対する製品の回収特性を検討した。

(2) 測定精度等

① 試験条件

本製品の測定精度等における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.3 測定精度等の試験条件

項目	内容
実証項目	実用的な性能・測定精度等(環境試料試験)
対象物質	クロロタロニル
対象製品名	クロロタロニル測定キット E （マイクロプレート）
製品番号	ロット番号：E-TPN001F
製造年月日	平成 17 年 9 月 29 日
測定範囲（製品仕様）	0.15～1.5μg/L
試験日時	平成 17 年 12 月 5 日　16：00　～　19：00
試験場所	名古屋市環境科学研究所
試験時室内温度	20℃±2℃
検量線用ソフト名	GENESIS-LITE（Labsystems 社製）
試験機関・担当者	名古屋市環境科学研究所大気騒音部　研究員　中島寛則(ELISA 法) 名古屋市環境科学研究所水質部　主任研究員　小島節子(機器分析法)

表 4.3.4 使用した環境試料

試料番号	地点名	採水日	採水量	備考
S1	矢田川大森橋	平成 16 年 12 月 20 日	3L×3 本	PH6.8　COD9.8mg/L Cl^-27mg/L
S2	庄内川明徳橋	同上	3L×3 本	PH6.7　COD9.0mg/L Cl^-1.14×10^3mg/L
S3	新川日の出橋	同上	3L×3 本	PH6.6　COD6.3mg/L Cl^-1.60×10^3mg/L

② 試験操作

グラスファイバーフィルター（GFC：孔径 1.2μm）を用いて、河川水をろ過したろ液を原水とし、原水を 10%メタノール溶液とした後３重測定し、その実測濃度を求めた。

5.試験結果

5.1 基本的な性能

(1) 測定範囲

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.1 検量線用標準溶液の測定データ

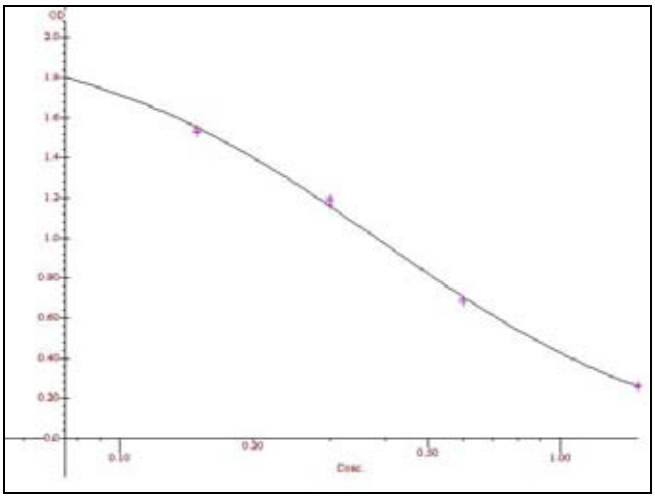
項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 (吸光度)	1	－	2.031	1.529	1.165	0.683	0.258
	2	－	2.024	1.534	1.183	0.694	0.268
	3	－	2.027	1.536	1.183	0.690	0.264

表 5.1.2 採用した回帰式係数[Y = B + (A – B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	2.03	-0.0689	3.25	1.26	*

* ソフトウエアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.1 検量線



② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.3 対象物質試料溶液の測定データ

項目			単位	試験用試料溶液				
				溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	溶液 S5
調製濃度			μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5
実測回数			回	3	3	3	3	3
ELISA 実測	吸光度	1	―	1.985	1.561	1.200	0.669	0.273
		2	―	2.069	1.578	1.178	0.660	0.269
		3	―	2.089	1.595	1.210	0.677	0.270
		平均	―	2.048	1.578	1.196	0.669	0.271
	換算値		μg/L		0.141	0.283	0.640	1.45
標準偏差			μg/L		0.0055	0.0072	0.0090	0.0083
変動係数			%		3.9	2.5	1.4	0.57
相対値*			%		91	95	104	98

* 調整濃度を 100%としたときの各実測濃度（3 重測定の平均値）との割合（%）

(2) 検出下限及び定量下限

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.4 検量線用標準溶液の測定データ

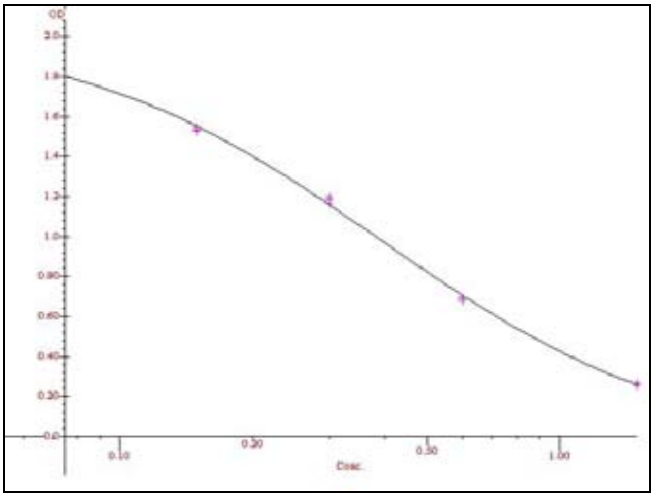
項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測（吸光度）	1	―	2.031	1.529	1.165	0.683	0.258
	2	―	2.024	1.534	1.183	0.694	0.268
	3	―	2.027	1.536	1.183	0.690	0.264

表 5.1.5 採用した回帰式係数[Y = B + (A – B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	2.03	-0.0689	3.25	1.26	＊

＊ ソフトウエアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.2 検量線



② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.6.1 対象物質試料溶液の測定データ

（検出下限１，定量下限）

項目			単位	試験用試料溶液							
				溶液 S1							
調製濃度			μg/L	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
実測回数			回	1	2	3	4	5	6	7	8
ELISA 実測	吸光度	1	―	1.538	1.56	1.597	1.632	1.578	1.584	1.617	1.579
		2	―	1.591	1.642	1.625	1.661	1.595	1.64	1.627	1.603
		3	―	1.562	1.596	1.582	1.526	1.586	1.614	1.616	1.586
		平均	―	1.564	1.599	1.601	1.606	1.586	1.613	1.620	1.589
	換算値		μg/L	0.146	0.134	0.134	0.133	0.139	0.131	0.128	0.138
標準偏差			μg/L	0.0055							

検出下限（3SD）＝0.016μg/L

定量下限（10SD）＝0.055μg/L

表 5.1.6.2 対象物質試料溶液の測定データ

(検出下限２)

項目		単位	試験用試料溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ		STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0		0.15	0.30	0.60	1.5
実測回数		回	10		3	3	3	3
ELISA 実測 (吸光度)	1	－	2.098	2.098	1.529	1.165	0.683	0.258
	2	－	2.094	2.104	1.534	1.183	0.694	0.268
	3	－	2.082	2.101	1.536	1.183	0.690	0.264
	4	－	2.046	2.083	－	－	－	－
	5	－	2.063	2.063	－	－	－	－

ブランク値の SD：0.018

ブランク値平均吸光度－3SD：2.08－0.055＝2.02

濃度換算値：0.011μg/L

(3) 繰返し再現性

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.7 検量線用標準溶液の測定データ

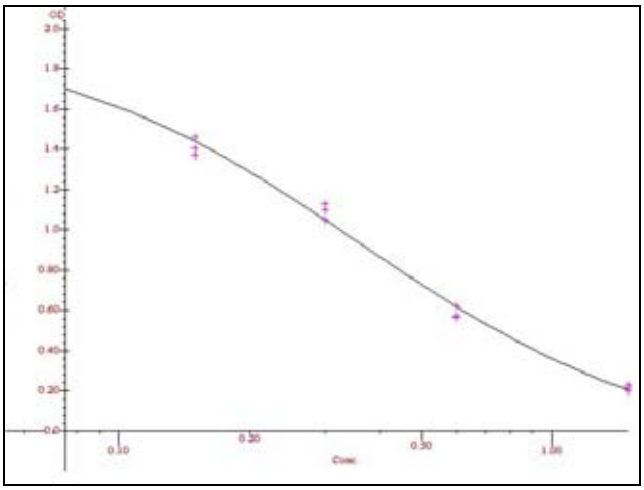
項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 (吸光度)	1	－	1.933	1.371	1.053	0.573	0.200
	2	－	1.963	1.407	1.102	0.567	0.216
	3	－	2.012	1.460	1.129	0.623	0.233

表 5.1.8 採用した回帰式係数[Y = B + (A – B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	1.97	-0.103	3.45	1.22	＊

* ソフトウエアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.3 検量線



② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.9 対象物質試料溶液の測定データ

項目			単位	試験用試料溶液							
				溶液 S3							
調製濃度			μg/L	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
実測回数			回	1	2	3	4	5	6	7	8
ELISA 実測	吸光度	1	－	0.717	0.721	0.705	0.742	0.729	0.771	0.802	0.729
		2	－	0.764	0.740	0.717	0.743	0.742	0.737	0.720	0.738
		3	－	0.722	0.729	0.745	0.746	0.751	0.736	0.703	0.722
		平均	－	0.738	0.730	0.722	0.744	0.741	0.748	0.742	0.730
	換算値		μg/L	0.496	0.500	0.506	0.488	0.491	0.485	0.490	0.500
標準偏差			μg/L	0.0068							
変動係数			%	1.4							

(4) 日間再現性

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.10.1 検量線用標準溶液の測定データ

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測（吸光度）	1	－	2.031	1.529	1.165	0.683	0.258
	2	－	2.024	1.534	1.183	0.694	0.268
	3	－	2.027	1.536	1.183	0.690	0.264

表 5.1.11.1 採用した回帰式係数[Y = B + (A – B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	2.03	-0.0689	3.25	1.26	＊

* ソフトウエアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.4.1 検量線

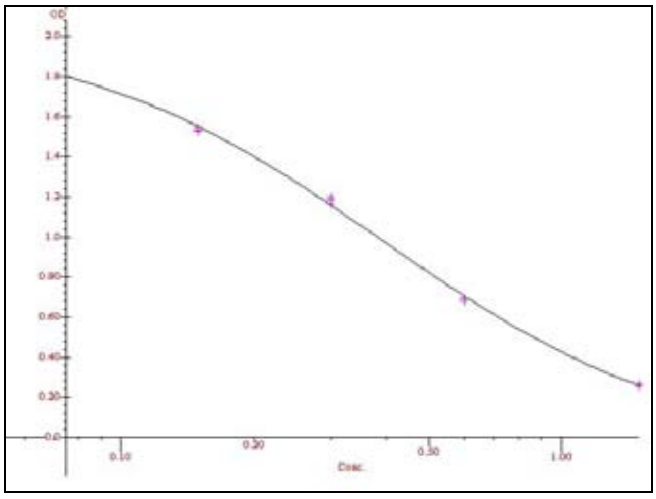


表 5.1.10.2 検量線用標準溶液の測定データ

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測（吸光度）	1	－	1.933	1.371	1.053	0.573	0.200
	2	－	1.963	1.407	1.102	0.567	0.216
	3	－	2.012	1.460	1.129	0.623	0.233

表 5.1.11.2 採用した回帰式係数[Y = B + (A – B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	1.97	-0.103	3.45	1.22	＊

* ソフトウエアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.4.2 検量線

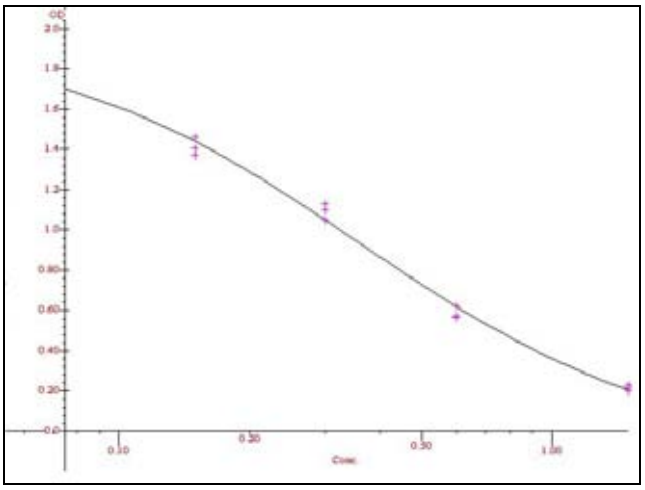


表 5.1.10.3 検量線用標準溶液の測定データ

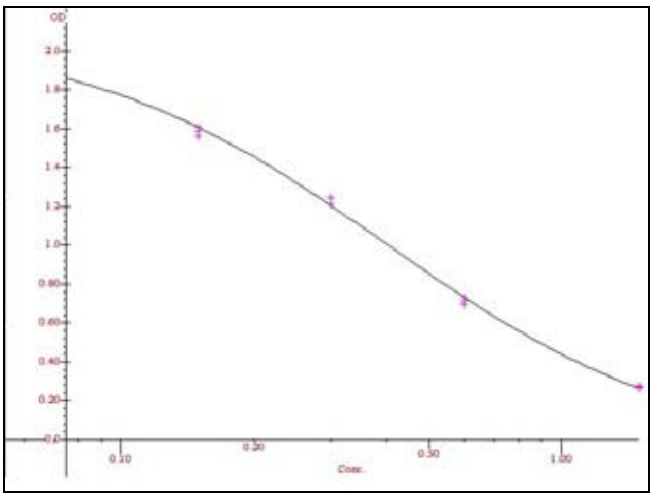
項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 （吸光度）	1	－	2.062	1.566	1.249	0.732	0.277
	2	－	2.103	1.590	1.246	0.712	0.266
	3	－	2.116	1.610	1.217	0.696	0.269

表 5.1.11.3 採用した回帰式係数[Y = B + (A – B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	2.09	-0.0776	3.19	1.27	＊

* ソフトウエアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.4.3 検量線



② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.12 対象物質試料溶液の測定データ

項目			単位	試験用試料溶液														
				溶液 S1			溶液 S2			溶液 S3			溶液 S4			溶液 S5		
				1日	2日	3日	1日	2日	3日	1日	2日	3日	1日	2日	3日	1日	2日	3日
調製濃度			μg/L	0	0	0	0.15	0.15	0.15	0.30	0.30	0.30	0.60	0.60	0.60	1.5	1.5	1.5
実測回数			回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
ELISA実測	吸光度	1	―	1.985	2.007	2.097	1.561	1.443	1.568	1.200	1.038	1.111	0.669	0.572	0.588	0.273	0.232	0.239
		2	―	2.069	2.032	2.064	1.578	1.454	1.582	1.178	1.048	1.104	0.660	0.575	0.589	0.269	0.226	0.237
		3	―	2.089	2.067	2.123	1.595	1.471	1.579	1.210	1.042	1.099	0.677	0.571	0.590	0.270	0.238	0.236
		平均	―	2.048	2.035	2.098	1.578	1.456	1.576	1.196	1.043	1.105	0.669	0.573	0.589	0.271	0.232	0.237
	換算値		μg/L	–	–	―	0.14	0.15	0.16	0.28	0.30	0.35	0.64	0.65	0.76	1.5	1.4	1.6
標準偏差			μg/L	―			0.010			0.033			0.066			0.12		
変動係数			%	―			6.7			11			9.7			8.0		

(5) 期間再現性

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.13.1 検量線用標準溶液の測定データ

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測（吸光度）	1	－	2.062	1.566	1.249	0.732	0.277
	2	－	2.103	1.590	1.246	0.712	0.266
	3	－	2.116	1.610	1.217	0.696	0.269

表 5.1.14.1 採用した回帰式係数[Y = B + (A – B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	2.09	-0.0776	3.19	1.27	＊

＊ ソフトウエアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.5.1 検量線

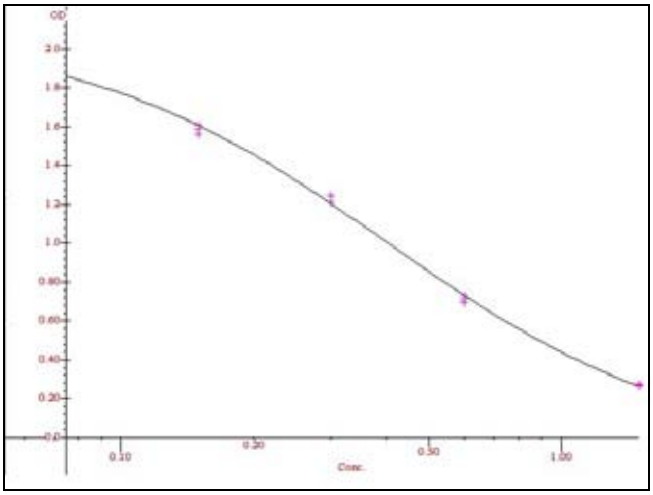


表 5.1.13.2 検量線用標準溶液の測定データ

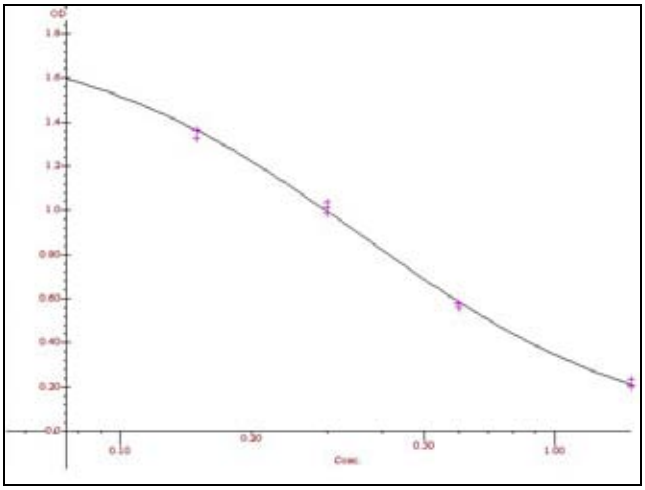
項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測（吸光度）	1	－	1.774	1.327	0.988	0.578	0.203
	2	－	1.839	1.361	1.015	0.559	0.236
	3	－	1.802	1.368	1.039	0.584	0.210

表 5.1.14.2 採用した回帰式係数[Y = B + (A – B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	1.80	-0.028	3.88	1.32	＊

* ソフトウエアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.5.2 検量線



② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.15 対象物質試料溶液の測定データ

項目			単位	試験用試料溶液									
				溶液 S1		溶液 S2		溶液 S3		溶液 S4		溶液 S5	
				0	1 ヶ月	0	1 ヶ月	0	1 ヶ月	0	1 ヶ月	0	1 ヶ月
調製濃度			μg/L	0	0	0.15	0.15	0.30	0.30	0.60	0.60	1.5	1.5
実測回数			回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
ELISA実測	吸光度	1	―	2.097	1.756	1.568	1.299	1.111	0.955	0.588	0.469	0.239	0.213
		2	―	2.014	1.743	1.582	1.276	1.104	0.978	0.589	0.487	0.236	0.223
		3	―	2.123	1.866	1.579	1.276	1.099	0.969	0.590	0.492	0.237	0.210
		平均	―	2.095	1.788	1.576	1.284	1.105	0.967	0.589	0.483	0.237	0.215
	換算値		μg/L	―	―	0.16	0.17	0.35	0.31	0.76	0.74	1.6	1.5
標準偏差			μg/L	―	―	0.0022	0.013	0.0024	0.0050	0.00082	0.015	0.0059	0.029
変動係数			%	―	―	1.4	7.8	0.70	1.6	0.11	2.0	0.36	2.0

(6) プレート間再現性

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.16.1 検量線用標準溶液の測定データ(プレート A)

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 (吸光度)	1	―	2.062	1.566	1.249	0.732	0.277
	2	―	2.103	1.590	1.246	0.712	0.266
	3	―	2.116	1.610	1.217	0.696	0.269

表 5.1.17.1 採用した回帰式係数[Y = B + (A – B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	2.09	-0.0776	3.19	1.27	＊

＊ ソフトウエアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.6.1 検量線

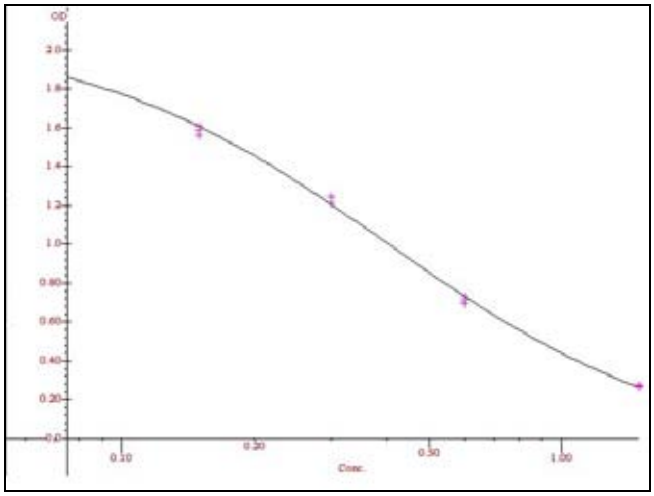


表 5.1.16.2 検量線用標準溶液の測定データ(プレート B)

項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 （吸光度）	1	－	1.925	1.591	1.290	0.702	0.258
	2	－	2.017	1.651	1.243	0.702	0.250
	3	－	2.427	1.658	1.272	0.696	0.256

表 5.1.17.2 採用した回帰式係数[Y = B + (A – B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	2.12	-0.0537	3.58	1.36	＊

＊ ソフトウエアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.6.2 検量線

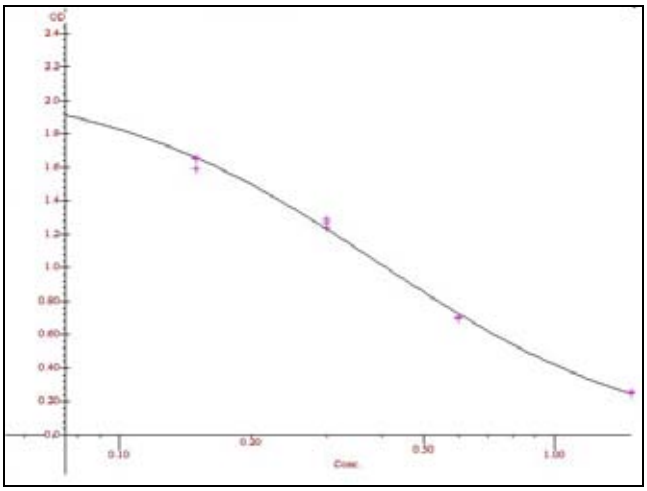


表 5.1.16.3 検量線用標準溶液の測定データ(プレート C)

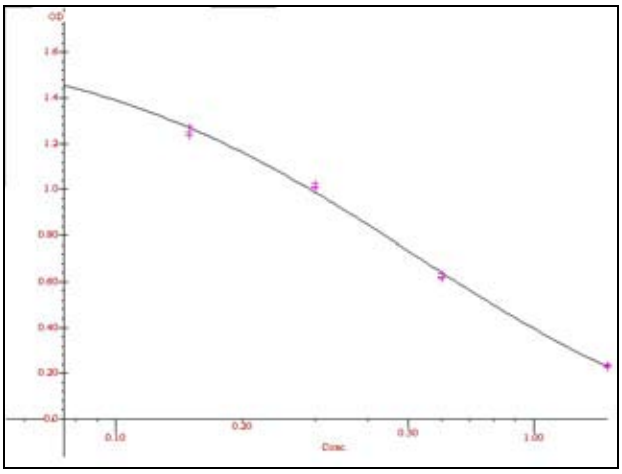
項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測 (吸光度)	1	―	1.659	1.274	1.004	0.636	0.227
	2	―	1.707	1.249	1.028	0.618	0.238
	3	―	1.650	1.237	1.009	0.620	0.233

表 5.1.17.3 採用した回帰式係数[Y = B + (A – B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	1.67	-0.231	2.04	1.07	＊

＊ ソフトウエアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.6.3 検量線



② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

（A,B:同一ロット、C:異なるロット）

表 5.1.18 対象物質試料溶液の測定データ

項目			単位	試験用試料溶液														
				溶液 S1			溶液 S2			溶液 S3			溶液 S4			溶液 S5		
				ﾌﾟﾚｰﾄ A	ﾌﾟﾚｰﾄ B	ﾌﾟﾚｰﾄ C	ﾌﾟﾚｰﾄ A	ﾌﾟﾚｰﾄ B	ﾌﾟﾚｰﾄ C	ﾌﾟﾚｰﾄ A	ﾌﾟﾚｰﾄ B	ﾌﾟﾚｰﾄ C	ﾌﾟﾚｰﾄ A	ﾌﾟﾚｰﾄ B	ﾌﾟﾚｰﾄ C	ﾌﾟﾚｰﾄ A	ﾌﾟﾚｰﾄ B	ﾌﾟﾚｰﾄ C
調製濃度			μg/L	0	0	0	0.15	0.15	0.15	0.30	0.30	0.30	0.60	0.60	0.60	1.5	1.5	1.5
実測回数			回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
ELISA実測	吸光度	1	－	2.097	2.204	1.682	1.568	1.652	1.259	1.111	1.199	0.951	0.588	0.636	0.548	0.239	0.235	0.219
		2	－	2.064	2.222	1.733	1.582	1.641	1.274	1.104	1.217	0.949	0.589	0.618	0.287	0.237	0.233	0.218
		3	－	2.123	2.293	1.755	1.579	1.645	1.316	1.099	1.219	0.992	0.590	0.618	0.559	0.236	0.235	0.223
		平均	－	2.095	2.240	1.723	1.576	1.646	1.283	1.105	1.212	0.964	0.589	0.624	0.553	0.237	0.234	0.220
	換算値		μg/L	－	－	－	0.160	0.154	0.133	0.348	0.307	0.315	0.761	0.701	0.716	1.62	1.56	1.53
標準偏差			μg/L	－			0.014			0.022			0.031			0.044		
変動係数			%	－			9.4			6.7			4.3			2.8		

(7) 交差反応性

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.19 検量線用標準溶液の測定データ

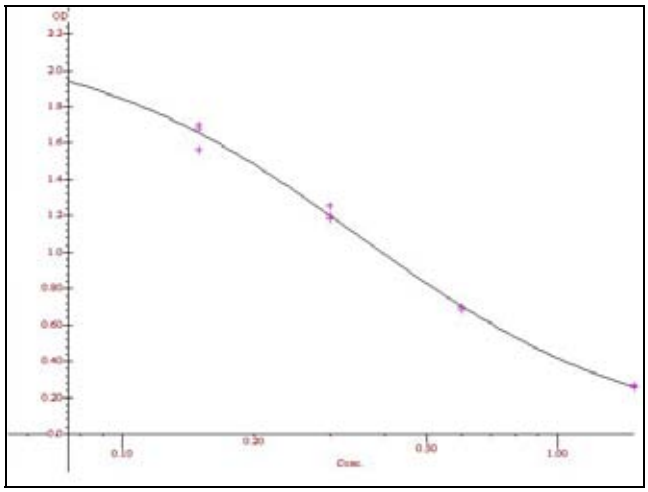
項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測（吸光度）	1	－	2.121	1.562	1.183	0.701	0.267
	2	－	2.197	1.702	1.203	0.702	0.258
	3	－	2.234	1.677	1.259	0.684	0.262

表 5.1.20 採用した回帰式係数[Y = B + (A – B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	2.08	0.0195	1.16	1.13	＊

* ソフトウエアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.7.1 検量線



② 試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.21 交差率

	クロロタロニル	フサライド	PCP
50%阻害濃度（μg/L）	0.27	087	228
交差率(%)	100	31	0.12

表 5.1.22.1 対象物質試料溶液の測定データ

クロロタロニル		単位	試験用試料溶液				
			溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	溶液 S5
所定濃度		μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測（吸光度）	1	－	2.135	1.563	1.130	0.627	0.252
	2	－	2.098	1.558	1.204	0.632	0.287
	3	－	2.204	1.603	1.189	0.654	0.280

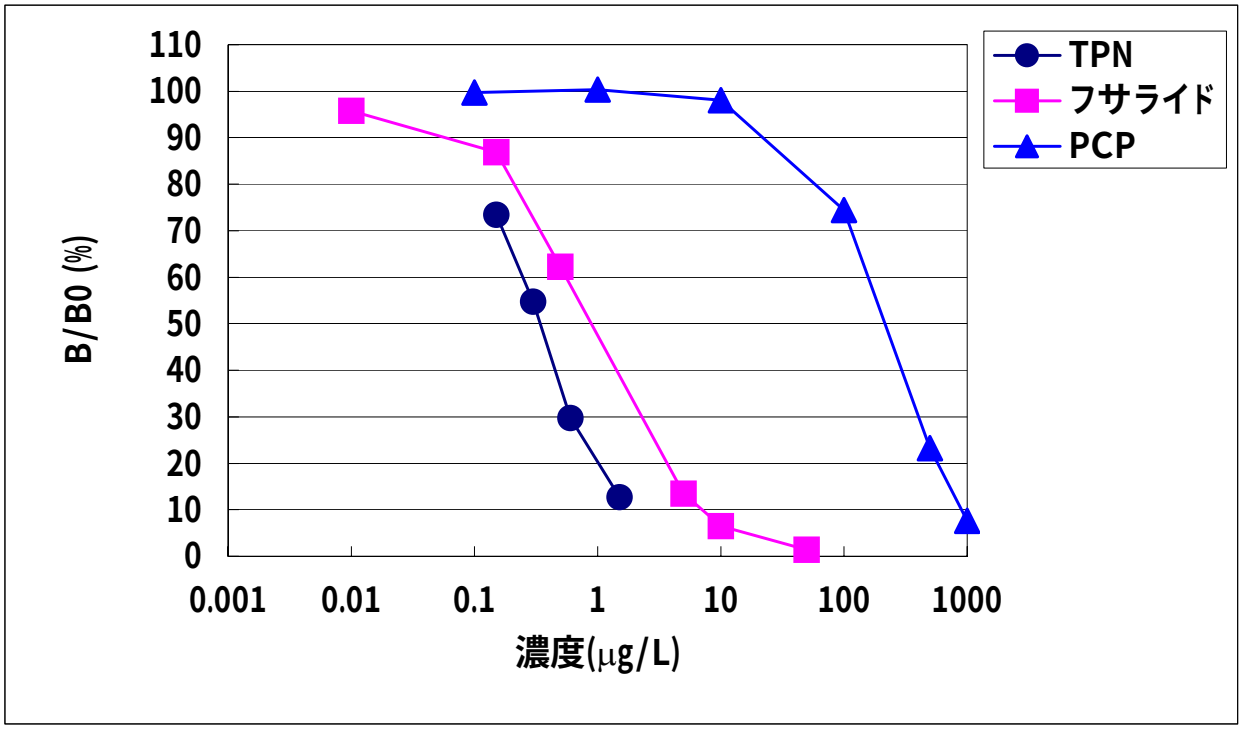
表 5.1.22.2 交差反応性物質試料溶液の測定データ

フサライド		単位	試験用試料溶液					
			溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	溶液 S5	溶液 S6
所定濃度		μg/L	0.01	0.15	0.5	5	10	50
実測回数		回	3	3	3	3	3	3
ELISA 実測（吸光度）	1	－	2.069	1.878	1.351	0.285	0.137	0.030
	2	－	2.058	1.853	1.334	0.287	0.140	0.029
	3	－	2.036	1.858	1.336	0.291	0.141	0.029

表 5.1.22.3 交差反応性物質試料溶液の測定データ

PCP		単位	試験用試料溶液					
			溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	溶液 S5	溶液 S6
所定濃度		μg/L	0.1	1	10	100	500	1000
実測回数		回	3	3	3	3	3	3
ELISA 実測（吸光度）	1	－	2.141	2.154	2.068	1.581	0.501	0.153
	2	－	2.175	2.186	2.081	1.620	0.509	0.166
	3	－	2.104	2.286	2.166	1.592	0.490	0.169

図 5.1.7.2 交差反応性


110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
B/B0 (%)
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(μg/L)
TPN
フサライド
PCP

5.2 実用的な性能

(1) 回収特性

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.2.1 検量線用標準溶液の測定データ

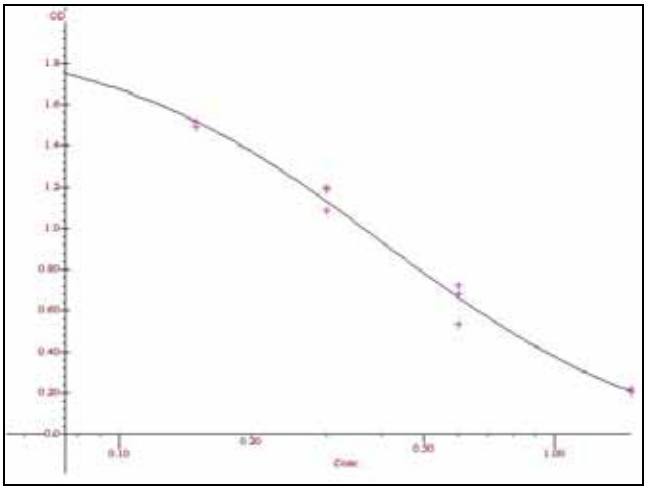
項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	STD1	STD2	STD3	STD4
所定濃度		μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測（吸光度）	1	－	1.978	1.492	1.191	0.723	0.216
	2	－	1.951	1.521	1.200	0.681	0.218
	3	－	1.937	1.492	1.085	0.532	0.202

表 5.2.2 採用した回帰式係数[Y = B + (A – B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	1.95	-0.102	3.30	1.33	＊

＊ ソフトウエアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.2.1 検量線



② 試験結果

河川水に測定範囲の中央付近（終濃度：0.5μg/L）のクロロタロニルを添加し、さらにフミン酸ナトリウムを添加（終濃度：0,1,5,10,50mg/L）した試験用試料溶液の測定結果は、以下のとおりであった。

表 5.2.3 回収特性の測定データ

項目			単位	試験用試料溶液(クロロタロニル 0.5μg/L 添加)				
フミン酸 Na 添加量			mg/L	0	1	5	10	50
実測回数			回	3	3	3	3	3
ELISA実測	吸光度	1	－	0.702	0.705	0.607	0.674	0.363
		2	－	0.698	0700	0.610	0.636	0.358
		3	－	0.696	0.678	0.632	0.636	0.369
		平均	－	0.699	0.694	0.616	0.649	0.363
	換算値		μg/L	0.570	0.574	0.649	0.618	1.025
標準偏差			μg/L	0.0028	0.014	0.015	0.026	0.013
変動係数			%	0.44	2.2	2.1	3.7	1.2
回収率			%	114	115	130	124	205

(2) 測定精度等

① 検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.2.4 検量線用標準溶液の測定データ

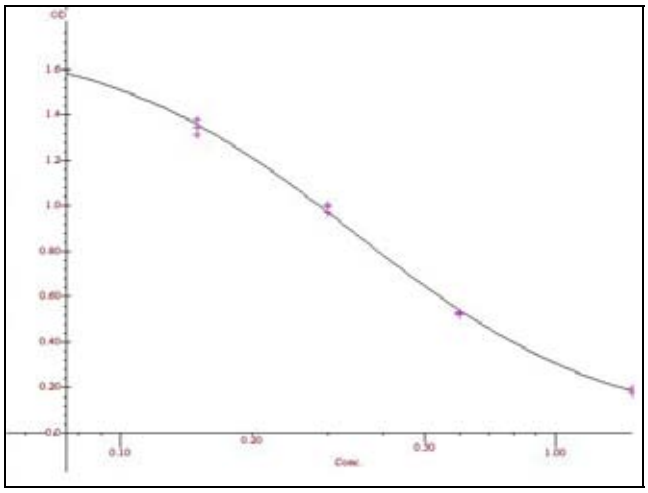
項目		単位	検量線用標準溶液				
			ﾌﾞﾗﾝｸ	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4
所定濃度		μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測（吸光度）	1	－	1.791	1.380	1.005	0.525	0.197
	2	－	1.744	1.343	0.999	0.532	0.200
	3	－	1.726	1.316	0.971	0.527	0.174

表 5.2.5 採用した回帰式係数[Y = B + (A – B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	1.75	0.00540	4.78	1.48	＊

＊ ソフトウエアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.2.2 検量線



② 試験結果記録

名古屋市内３地点における河川水中に含まれるクロロタロニル濃度は以下のとおりであった。

表 5.2.6 実試料での測定結果

項目			単位	試験用試料溶液		
				大森橋	明徳橋	日の出橋
実測回数			回	3	3	3
ELISA	吸光度	1	—	1.882	1.952	2.026
		2	—	1.906	1.915	2.004
		3	—	1.872	2.051	1.982
		平均	—	1.887	1.973	1.987
	換算値		μg/L	—	—	—
	標準偏差		μg/L	—	—	—
	変動係数		%	—	—	—
GC／MS	測定値	1	μg/L	ND	ND	ND
		2	μg/L	ND	ND	ND
		3	μg/L	ND	ND	ND
		平均	μg/L	—	—	—
	標準偏差		μg/L	—	—	—
	変動係数		%	—	—	—

濃度の単位はμg/L 。ELISA の検出下限 1 は 0.016μg/L 、検出下限 2 は 0.011μg/L 。

GC/MS の検出下限(MDL)は 0.0069μg/L。

表 5.2.7 添加回収試験結果（クロロタロニル 0.17μg/L 添加）

項目			単位	試験用試料溶液		
				大森橋	明徳橋	日の出橋
実測回数			回	3	3	3
ELISA	吸光度	1	―	1.248	1.198	1.208
		2	―	1.292	1.192	1.195
		3	―	1.285	1.204	1.253
		平均	―	1.275	1.198	1.219
	換算値		μg/L	0.18	0.21	0.20
	標準偏差		μg/L	0.0081	0.0020	0.0112
	変動係数		%	4.6	1.0	5.6
	回収率		%	107	123	118
GC／MS	測定値	1	μg/L	0.19	0.21	0.18
		2	μg/L	0.21	0.20	0.19
		3	μg/L	0.18	0.18	0.19
		平均	μg/L	0.19	0.20	0.19
	標準偏差		μg/L	0.015	0.015	0.0058
	変動係数		%	7.1	7.8	3.0
	回収率		%	114	115	111

濃度の単位はμg/L 。ELISA の検出下限 1 は 0.016μg/L 、検出下限 2 は 0.011μg/L 。GC/MS の検出下限(MDL)は 0.0069μg/L。

6.実証試験結果の検討と考察

（1）製品性能の信頼性

実証試験で実施した基本性能７項目の全てについて、申請データ(0.15～1.5μg/L)の濃度範囲において十分な信頼性が確認された。

（2）一般環境モニタリングでの実用性

河川水試料ろ過水を用いた添加回収試験の結果から、妨害物質（フミン酸ナトリウム）による正の妨害は認められたものの、検出感度及び測定精度とも実用に耐えうると考えられた。今後、マトリックスの異なる環境試料に対するデータを蓄積することにより、環境モニタリングへの実用化が可能と考えられた。

（3）製品操作等の簡便性

一般環境モニタリングでの使用を想定した場合、測定結果が得られるまで約２～３時間で、同時に最大２６試料（３重測定）の測定が可能となる。なお、本試験での GC/MS－SIM 法では、３試料（３重測定）の測定に約３日が必要であった。

取扱説明書については、わかりやすく説明してあり、特に問題はないと考えられる。

（　計　　画　　書）

環境技術実証モデル事業

化学物質に関する簡易モニタリング技術分野

化学物質に関する簡易モニタリング技術
実証試験計画書

環境技術開発者	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
技術・製品の名称	《技術名》ELISA法（酵素免疫測定法） 《製品名》クロロタロニル測定キットＥ

平成１７年１０月

名　古　屋　市

はじめに

本実証試験計画書は、「化学物質に関する簡易モニタリング技術　実証試験要領（第２版）（平成１７年５月１６日　環境省総合環境政策局）」（以下、「実証試験要領」という。）に基づいて選定された実証対象技術について、実証機関及び環境技術開発者の２者が協議、合意の上、実証試験要領に準じて策定したものである。

（実証機関）
名古屋市環境科学研究所
所　　長　　柴田　伸幸

（環境技術開発者）
株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
代表取締役社長　　河野　猛

目　次

１．実証試験の概要と目的 …… 1
1.1 実証試験の概要と目的 …… 1
1.2 実証試験の視点 …… 1
２．実証試験の参加組織と実証試験参加者の責任分掌 …… 2
2.1 実証試験の参加組織 …… 2
2.2 実施体制 …… 2
2.3 実証試験参加者の責任分掌 …… 3
３．実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要 …… 4
3.1 実証対象技術の原理 …… 4
3.2 実証対象製品のデータ …… 4
４．実証試験のデザイン …… 6
4.1 実証試験の期間 …… 6
4.2 実証試験の内容 …… 7
4.3 実証対象製品の受け入れと管理 …… 8
4.4 実証試験の方法 …… １０
（1）基本的な性能試験 …… １１
①測定範囲試験 …… １１
②検出下限及び定量下限試験 …… １１
③繰返し再現性試験 …… １１
④日間再現性試験 …… １２
⑤期間再現性試験 …… １２
⑥プレート間再現性試験 …… １２
⑦交差反応性試験 …… １２
（2）実用的な性能試験 …… １３
①回収特性試験 …… １３
②測定精度試験 …… １３
５．データの品質管理 …… １４
６．データの管理、分析、表示 …… １４
７．監査 …… １４
８．評価 …… １４

付録１：技術の先進性、その他……１５
付録２：環境技術開発者による性能試験結果（資料１～資料５）……１６
付録３：取扱説明書……２６
付録４：品質管理マニュアル　ELISA 法
付録５：品質管理マニュアル　機器分析

１．実証試験の概要と目的

１.1 実証試験の概要と目的

既に適用可能な段階にありながら、環境保全効果等についての客観的な評価が行われていないために普及が進んでいない先進的環境技術について、その環境保全効果等を第三者が客観的に実証する事業をモデル的に実施することにより、環境技術実証の手法･体制の確立を図るとともに、環境技術の普及を促進し、環境保全と環境産業の発展に資することを目的とするものである。

本実証試験は、平成１７年５月１６日　環境省総合環境政策局が策定した実証試験要領（第２版）に基づいて選定された実証対象技術について、同実証試験要領に準拠して実証試験を実施することで、製品性能の信頼性等を客観的に実証するものである。

本実証試験の化学物質簡易モニタリング技術とは、操作・管理の容易性や定量の高感度化などの特徴をもったもので、スクリーニング的な活用や簡易な方法で異常値を監視できることなどへの有用性が期待できるものを指すものとする。

対象とする技術は、一般環境モニタリングでの利活用の可能性を念頭に、抗原抗体反応を応用した酵素標識免疫測定法（ＥＬＩＳＡ法）による簡易分析技術とする。

1.2 実証試験の視点

本実証試験では、以下の視点から実証を行うものとする。

○　製品性能の信頼性

○　一般環境モニタリングでの実用性

○　製品操作等の簡便性

２．実証試験参加組織と実証試験参加者の責任分掌

2.1 実証試験参加組織

実証試験に参加する組織は、下表に示すとおりである。

表 2.1　実証試験参加組織

実証機関	団体名	名古屋市環境科学研究所
	住所	〒457-0841　名古屋市南区豊田 5-16-8
	担当者所属・氏名	水質部　小島節子
	電話番号	052-692-8481
	FAX 番号	052-692-8483
	E-mail アドレス	kojima@nagoyakankaken.office.to
環境技術開発者	企業名	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
	住所	〒601-8315　京都市南区吉祥院車道町 48 番地
	担当者所属・氏名	試薬事業部　開発・製造部　伊東　茂壽
	電話番号	075-692-1786
	FAX 番号	075-692-1790
	E-mail アドレス	Shigekazu.ito@horiba.com

2.2 実施体制

実証試験の実施体制は、下図に示すとおりである。

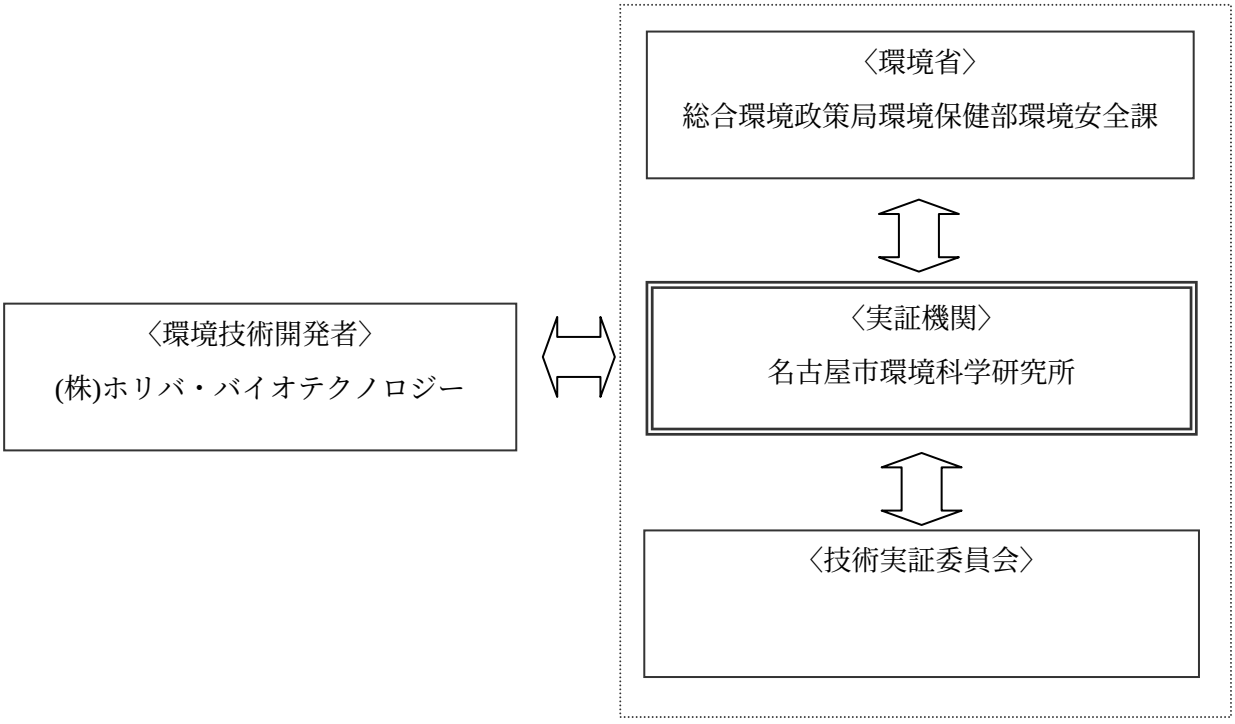


図 2.2　実証試験の実施体制

2.3 実証試験参加者の責任分掌

実証試験参加者とその責任分掌は、下表に示すとおりである。

表 2.3　実証試験参加者の責任分掌

実証試験参加機関	責任分掌	参加者	
		部署	氏名
実証機関	実証試験の全体の統括責任者	所長	柴田　伸幸
	実証試験における ELISA 法の責任者	水質部長	須賀　博之
	実証試験における ELISA 法担当者のリーダー	大気騒音部 研究員	中島　寛則
	実証試験における ELISA 法担当者	水質部 主任研究員	小島　節子
	実証試験における機器分析の責任者	水質部長	須賀　博之
	実証試験における機器分析担当者のリーダー	水質部 主任研究員	小島　節子
	実証試験における機器分析担当者	大気騒音部 研究員	中島　寛則
	実証試験における精度・技術管理者	ﾀﾞｲｵｷｼﾝ分析研究ｾﾝﾀｰ長	加藤　光雄
	実証試験における精度管理担当者	水質部 主任研究員	安藤　良
	実証試験における精度管理担当者	ﾀﾞｲｵｷｼﾝ分析研究ｾﾝﾀｰ 主任研究員	大場　和生
環境技術開発者	実証対象製品全体の総括責任者	製造・開発部 部長	伊東　茂壽
	実証対象製品の提供	製造・開発部 次長	門脇　篤
	実証対象製品の取扱説明書等の提供	製造・開発部 部長	伊東　茂壽
	実証試験実施上の参考情報の提供	製造・開発部 次長	門脇　篤

３．実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要

3.1 実証対象技術の原理

この実証対象製品は、申請者が開発したクロロタロニルに対する特異的なモノクローナル抗体を応用した、環境中（対象環境媒体：水質、底質、生物、その他）のクロロタロニル測定 ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応（クロロタロニル濃度が高い試料では吸光度が低く、クロロタロニル濃度が低い試料では吸光度が高い）で、マイクロプレート（96 ウエル）を使用したキットである。

3.2 実証対象製品のデータ

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、下表に示すとおりである。

表 3.2　実証対象製品のデータ（1）

項目	記　入　欄
製品名	クロロタロニル測定キットＥ
型番	ＥＬ108-01
販売・製造元	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
重量（g）	350g
価格（円）	105,000 円
分析対象物質	クロロタロニル
対象環境媒体	(水質)・底質・生物・その他（　　）
利用用途	環境水その他の水質モニタリング
標準試薬・種類	付属（調製済／(調製要)）
操作環境（室温）	室温（１５～２５℃）
製品保管条件	４～８℃
製品保証期間	製造後３ヶ間
同時測定数（最多）	４６試料
測定時間	２～３時間

表 3.2　実証対象製品のデータ（2）

項目	記　入　欄
１．基本的な性能	
①測定範囲	0.15～1.5ppb（添付資料 1）
②検出下限及び定量下限	
③繰返し再現性	標準偏差：0.01～0.07　変動係数：5.0～5.4%（添付資料２）
④日間再現性	標準偏差：0.01～0.04　変動係数：3.6～5.6%（添付資料２）
⑤期間再現性	保存安定性（添付資料３）
⑥プレート間再現性	
⑦交差反応性	交差率：38.7%（フサライド）、1.7%（ＰＣＰ）（添付資料４）
⑧その他	
２．実用的な性能	
①回収特性	回収率：94.1～109.4%（添付資料５）
②測定精度等	
③その他	
試験責任者	伊藤　茂壽
試験年月日	平成１７年８月３１日

４．実証試験のデザイン

4.1 実証試験の期間

実証試験の期間は、平成 17 年 10 月中旬～平成 17 年 11 月下旬とする。また、その期間のスケジュール（予定）は、下表に示すとおりである。

表 4.1　実証試験のスケジュール（予定）

	10 月			11 月				12 月	2 月
	1 週	2 週	4 週	1 週	2 週	3 週	4 週	3 週	
実証試験計画の策定									
対象技術の選定、計画書案作成	○	○							
実証試験計画書策定、承認		○							
実証試験の実施									
測定範囲の検討			○						
検出限界及び定量限界の検討			○						
繰返し再現性の検討			○						
日間再現性の検討			○						
期間再現性の検討			○				○		
プレート間再現性の検討			○						
交差反応性の検討				○					
回収特性の検討				○	○	○			
測定精度の検討				○	○	○			
監査の実施					○				
実証試験中間報告					○				
技術実証委員会の実施	○				○			○	
報告書の提出									○

4.2 実証試験の内容

実証試験項目の内容は、表 4.2 のとおりである。

表 4.2 実証項目の内容

項目	内容
1．基本的な性能	
(1)測定範囲	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の変動等に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(2)検出下限及び定量下限	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の標準偏差に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(3)繰返し再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(4)日間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なる条件（日付）での同一操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(5)期間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて製造後一定期間経過した製品の操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(6)プレート間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なるロットや異なるプレート間での ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(7)交差反応性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて類似物質別の ELISA 測定値の相違等に基づき、交差反応性を実証する。
2．実用的な性能	
(1)回収特性	提出書類の内容、環境試料を模擬し市販標準品で混合調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の比較に基づき、回収特性を実証する。
(2)測定精度	環境試料（濃度未知）を用いた ELISA 測定値の変動や操作手順・操作方法の特徴等に基づき、測定精度、前処理妥当性、操作簡便性等による環境試料への適用性を実証する。

4.3 実証対象製品の受け入れと管理

（1）実証対象製品（ELISA キット）の受け入れ

受領の記録を ELISA キット管理表（様式 4.3）に記入し、以下の事項を確認する。

〇管理表と ELISA キットの品名、数量が一致していること。

〇ELISA キットの搬送が適切に取り扱われていること。

〇ELISA キットに不適合又は疑義を発見したときは、適切な処置をとる。

（2）ELISA キットの管理

〇ELISA キットは、変質しないように、取扱説明書に記載された保管条件で適切に保管・管理する。

〇ELISA キットの分割を行う場合は、汚染や品質低下のない方法で行い、識別番号等必要な表示を行うとともに、分割の年月日その他必要な事項を管理表に記録する。

ELISA キット管理表（様式 4.3）

受領年月日　　時　　分

番号（管理番号）　　－

メーカー名

品名

Lot. No.

搬入時確認事項

□　包装等に破損がない　　保管場所

□　保管温度（　　℃）　　保管温度

□　搬入時の温度管理

□　使用期限

□　その他異常なし

担当者

（移動・分割等の記録）

番号（管理番号）　　－

メーカー名

品名

Lot. No.

搬入時確認事項

□　包装等に破損がない　　保管場所

□　保管温度（　　℃）　　保管温度

□　搬入時の温度管理

□　使用期限

□　その他異常なし

担当者

（移動・分割等の記録）

4.4 実証試験の方法

基本的な性能試験及び実用的な性能試験において、以下の操作は共通である。

ア．製品の操作

製品の操作にあたっては、製品の取扱説明書を遵守するとともに、「品質管理マニュアル　ELISA法（クロロタロニル）」の試験操作手順（一般的な事項）に従って行う。

イ．検量線作成用標準溶液の調製

キットに付属する標準物質を用い、キットが指定する希釈濃度系列（以下、指定濃度系列）を作成する。

ウ．吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（Labsystems 社製 Multiskan MS）で測定し、指定濃度系列及び各試験用試料溶液の吸光度とする。

エ．検量線の作成

プレート毎に同時に測定したゼロブランク（BLK：添付の希釈液等）及び標準溶液指定濃度系列の吸光度（３重測定の平均値）から、４-parameter logistic fitting 後、検量線を作成する。（検量線作成用の解析ソフト：GENESIS-LITE）

オ．実測濃度の算出

前項で作成した検量線を用いて、各試験用試料溶液の吸光度から各実測濃度を算出する。

（1）基本的な性能試験

実証対象製品の基本的な性能を検討するため、製品仕様の信頼性等の観点から市販標準品（以下、市販標準物質）で調製した試験用試料溶液を用いた実証試験を行う。

○　試験用試料溶液の調製

クロロタロニルの市販標準物質（和光純薬製　TPN 標準品（残留農薬試験用））を用いて、10%メタノールを希釈溶媒として、試験用試料溶液を調製する。

標準溶液指定濃度系列及び試験用試料溶液の調製濃度は、表 4.4.1 のとおりである。

表 4.4.1　標準溶液指定系列及び試験用試料溶液

試験項目	物質名	試料溶液調製濃度（μg/L）
標準溶液指定濃度系列	クロロタロニル	0,　0.15,　0.3,　0.6,　1.5
①測定範囲 ④日間再現性 ⑤期間再現性 ⑥プレート間再現性	クロロタロニル	0,　0.15,　0.3,　0.6,　1.5
②検出下限１，２及び定量下限	クロロタロニル	0,　0.15
③繰返し再現性	クロロタロニル	0.5
⑦交差反応性	フサライド PCP	0.01，0.15，0.5，5.0，10，50 0.1，1.0，10，100，500，1000

①　測定範囲試験

調製した試験用試料溶液を用いて、各調製濃度につき３重測定を行い、3 個の吸光度それぞれから求めた実測濃度より、平均値、標準偏差、変動係数を求める。

これを基に、各調製濃度と実測濃度との比較、変動係数から指定された測定範囲の妥当性について検討する。

②　検出下限及び定量下限試験

測定範囲の下限付近に調製した試験溶液を 8 回測定し、その実測濃度より標準偏差（SD）を求める。求めた SD から 3SD 及び 10SD をそれぞれ検出下限 1 及び定量下限とし、申請データと比較検討する。これとは別に、指定濃度系列 0 濃度の吸光度を 10 回測定し、その標準偏差(SD)から得られる 3SD 値（吸光度）を 0 濃度の吸光度から差し引いた吸光度より、検量線を用いて換算濃度を求める。この濃度を検出下限 2 とし、検出下限 1 及び申請データと比較検討する。

③　繰返し再現性試験

測定範囲の直線域に調製した試料溶液を 3 重測定で 8 回測定し、得られた 8 個の実測濃度より平均値、標準偏差、変動係数を求める。

求めた変動係数（n=8）から、繰返し再現性について検討する。

④　日間再現性試験

同一測定者が 1 週間の異なる 3 日間において、同一ロットの異なるプレートを用いて「①測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、3 日間の比較から日間再現性について検討する。

⑤　期間再現性試験

同ロット（製造年月日が同じ）の２枚のプレートを用いて、1 ヶ月以上離れた時期に「①測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、プレート間の比較から期間再現性について検討する。

⑥　プレート間再現性試験

同一ロット 2 プレート及び異なるロット 1 プレートの 3 プレートを用いて、同日に「①測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、同一ロット及び異なるロットの比較からプレート間再現性について検討する。

⑦　交差反応性試験

クロロタロニル及び類似物質(フサライド、PCP）について調製した試料溶液で吸光度曲線（実測値は 3 重測定の平均値から求める）を描き、吸光度曲線から類似物質の 50%発色阻害濃度を求める。（クロロタロニルの 50%阻害濃度/類似物質の 50%阻害濃度）×100（%）で交差率を求め、類似物質の交差反応性を検討する。

類似物質に関して、調製した試料溶液のみでは 50%発色阻害濃度が求められない場合は、50%発色阻害濃度が得られるように高濃度側を加えた濃度系列を作り、試験をやり直す。予想される高濃度側の濃度範囲が実用的でない場合には、20 または 10%阻害濃度で代用する。

（2）実用的な性能試験

実証対象製品の実用的な性能を検討するため、環境試料への適用性等の観点から環境試料試験による実証試験を行う。

① 回収特性試験

グラスファイバーフィルター（GFC：孔径 1.2μm）を用いて、河川水をろ過したろ液を原水とし、それに測定範囲の中央付近となるように市販標準物質（クロロタロニル）を添加するとともに、妨害物質としてフミン酸ナトリウムを一定濃度添加して、試験用試料溶液を調製する。試験用試料溶液の調製濃度（添加濃度）は、表 4.4.2 のとおりである。

調製した試験用試料溶液について、３重測定した実測濃度から平均値、回収率を求め、フミン酸ナトリウムに対する製品の回収特性を検討する。

表 4.4.2 試験用試料溶液

物質名	試料溶液調製濃度
分析対象物質：クロロタロニル	0.5μg/L
妨害物質：フミン酸ナトリウム	1，5，10，50 mg/L

② 測定精度試験

３地点から採取した河川水について、グラスファイバーフィルターによるろ過及び固相カートリッジを用いた固相抽出法（キットの取扱説明書）による前処理を行って測定する。

同一河川水について、所定のマニュアル（前処理法を含む）に従って機器分析を行い、ELISA 法と機器分析法の実測値を比較し、環境試料への適用可能性について検討する。

また、製品の操作簡便性（測定時間、操作数）について、環境試料への適用性の観点から検討する。

５．データの品質管理

実証試験は、「品質管理マニュアル」に従って行い、作成した文書及び記録については、適切に保管・管理する。

６．データの管理、分析、表示

（１）データの管理

実証試験で得られたデータは、識別し、適切に収集し、見出し付け、ファイリングし、10 年間維持した後、廃棄するものとする。

（２）データの分析と表示

実証試験で得られたデータは、必要に応じて統計処理を行うとともに、使用した数式を実証試験結果報告書に記載する。

７．監査

実証試験が適切に実施されていることを確認するために実証試験の期間中に１回以上監査を実施する。

８．実証試験の評価

実証試験結果の評価は、3.2 実証対象製品のデータと本実証試験結果を比較し評価する。

なお、3.2 実証対象製品のデータがないものについては、ELISA 法による一般的な製品のデータを参照して評価する。

また、「実用的な性能試験」結果については、環境試料への適用性等の観点から評価する。

付録１　技術の先進性、その他

１．技術の先進性について

技術の先進性、特許・実用新案等の申請・取得状況、論文発表、受賞歴等があれば記入して下さい。
技術の先進性 クロロタロニルのイムノアッセイキットについては、ポリクロナール抗体を使ったチューブ法が販売されているが、今回申請するキットはモノクロナール抗体を使用した９６穴マイクロタイタープレートであるので、常に一定品質の製品を供給することができ、また専用および汎用のいずれのプレートリーダーでの測定が可能である。

２．その他

クロロタロニルは「水道法水質管理目標設定項目の対象（目標値 0.05 ㎎/L 以下）」、「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針値（0.4 ㎎/L 以下）」が定められており、環境水での適応を確認するため、申請するものです。

付録２　環境技術者による性能試験結果

資料１

測定範囲の設定（クロロタロニル）

1.　検量線作成及び測定範囲の上限値と下限値の設定
1-1.目的
吸光度がBo（農薬無添加区）の20%～80%に相当する濃度を検量線から読み取り、測定範囲設定する。

1-2.材料

キット用抗体ﾌﾟﾚｰﾄ
キット用酵素標識物試薬
検量線用標準液
発色液（TMB試薬）
発色停止液（1N 硫酸）

1-3.方法
1-3-1.抗体プレート
4℃で保管してあるキット用抗体プレートを30分間25℃に静置して使用した。

1-3-2.酵素標識物試液の調製
4℃で保管してあるキット用酵素標識物試薬を30分間25℃に静置した。
↓
蒸留水6 mLで溶解し、酵素標識物試液とした。

1-3-3.検量線溶液の調製
標準品10 mgを10 mLメスフラスコに入れて、メタノールでフィルアップし、1000 ppm標準品メタノール溶液を調製した。
↓
メタノールで段階希釈し、10 ppmの検量線用標準液を調製した。
↓
下表に示すように検量線用標準液を２段階希釈して希釈列を調製した。
↓
4 mLの10%メタノールを添加した試験管に検量線用標準液を各試験管に40 μl添加して、検量線溶液とした。

検量線溶液の調製　　（2段階希釈）

	1	2	3	4	5	6	7	8
検量線用標準液　(ppb)	1000	300	200	60	30	20	10	0.0
希釈後　(ppb)	10.0	3.0	2.0	0.6	0.3	0.2	0.1	0.0

1-3-4.アッセイ
検量線溶液と酵素標識物溶液を等量混合して、混合試液とした。
↓
100 μL/wellで各混合試液を抗体プレートに分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄を３回実施した。
↓
100 μL/wellで発色液を分注した。
↓
発色反応　25℃、10分間静置した。
↓
反応停止　反応停止液100 μL/well分注した。
↓
測定（450 nm）　　※測定機：スマートリーダー

1-4.結果
（農薬添加区の吸光度）／（農薬無添加区の吸光度）の値（B/Bo）について、B/Bo=0.8付近
B/Bo=0.8付近の濃度（測定下限；L）として0.15ppb、及びB/Bo=0.2付近の濃度（測定上限；
して1.5 ppbを選定して、測定範囲上限および下限に設定した。

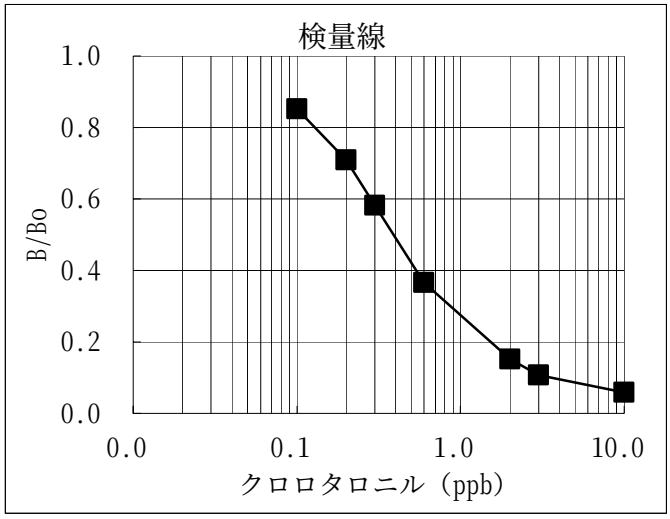


図１．クロロタロニル検量線（B/Bo表示）

資料２

再現性（クロロタロニル）

１．目的
キットの再現性（同時、日間）を確認する。

２．材料
クロロタロニル測定キット
きゅうり
1000 ppm　標準品メタノール溶液

３．方法
3-1.添加用標準液の調製
1000 ppm　標準品メタノール溶液
↓
メタノールを用いて下記の表の様に添加用標準液を調製した。

添加用標準液の濃度

	A	B	C
標準液（ppm）	0.3	0.2	0.05

3-2.測定試液の調製
農産物試料
↓
磨砕　農産物を細断し、ミキサーでペースト状にした。
↓
ペースト5 ｇを 50 mL遠沈管×3個にそれぞれ正確に量りとった。
↓
添加用標準液をそれぞれ下記の表のように1 mLずつ添加した。
↓
↓　　添加用標準液の濃度およびサンプル中の農薬濃度

添加試料	添加用標準液調製濃度	ホモジネート中農薬濃度	抽出・希釈後濃度	添加量
	ppm	ppm	ppb	mL
A	0.30	0.06	1.18	1.0
B	0.15	0.03	0.59	1.0
C	0.05	0.01	0.20	1.0

↓
遠沈管のふたを閉め、よく振った。
↓
メタノール24mLを添加した。
↓
振とう機（110回/分)で30分間振とうした。
↓
綿球を詰めたシリンジでろ過した。
↓
ろ液を標準品を添加した農産物抽出液(85%MeOH相当）とした。
↓
標準品を添加した農産物抽出液1 mLをﾊﾞｲｱﾙ瓶にとり、7.5 mLの蒸留水を添加し、
よく混和した（8.5倍希釈）。これを測定試液とした。

3-3.キットの調製
4℃で保管してあるキット用抗体プレート、酵素標識物試薬および標準試薬を
取り出し、30分間25℃に静置した。
↓
酵素標識物試薬に精製水 6 mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。
標準試薬に10%メタノール　1.0 mLを添加、溶解して標準試液とした。

3-4.アッセイ
試験管に酵素標識物試液と測定試液、または酵素標識物試液と標準試液を等量混合し、
混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100 μL/wellで分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄3回実施した。
↓
発色液を100 μL/well分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止　反応停止液100 μL/well分注した。
↓
測定（450nm）　※測定機：スマートリーダー

3-5. 同時再現性
濃度の異なる３試料を各々8点おき、各点ごとに濃度を測定して、値のばらつき具合を確認した。

3-6. 日間再現性
同一測定者が日を変えて3回行った。（8重測定）

４．結果

表2-1　同時再現性

	測定値（ppb）		
	試料　A	試料　B	試料　C
1	0.25	0.63	1.26
2	0.26	0.72	1.26
3	0.28	0.72	1.20
4	0.27	0.68	1.09
5	0.28	0.70	1.26
6	0.25	0.69	1.16
7	0.29	0.66	1.28
8	0.25	0.64	1.26
平均	0.27	0.68	1.22
標準偏差	0.01	0.03	0.07
変動係数(%)	5.4	5.0	5.4

表2-2　日間再現性

	測定値（ppb）		
	試料　A	試料　B	試料　C
1日目	0.27	0.68	1.22
2日目	0.25	0.63	1.14
3日目	0.24	0.70	1.16
平均	0.25	0.67	1.17
標準偏差	0.01	0.03	0.04
変動係数(%)	5.6	5.2	3.6

５．考察
きゅうりのペースト試料にクロロタロニルを添加した3試料を用いて、同時再現性および日間再現性を検討した。結果は、それぞれ表2-1および2-2に示す通りで変動係数が各々5.0～5.4%及び3.6～5.6%であり、同時再現性および日間再現性は良好であった。

資料３

保存安定性試験（クロロタロニル）

１．目的

キットの8℃における保存安定性を確認する。

２．材料

クロロタロニル測定キット：2ロット

３．方法

3-1.キットの調製

8℃保存キットを30分間25℃に静置した。

↓

酵素標識物試薬に精製水6 mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。

標準試薬に10%メタノール1.0 mLを添加、溶解して標準試液とした。

3-2.アッセイ

試験管に酵素標識物試液と標準試液及び酵素標識物試液と10%メタノールを等量混合して、混合試液とした。

↓

各混合試液を抗体プレートに100 μL/well分注した。

↓

25℃　1時間静置した。

↓

吸引、洗浄3回実施した。

↓

発色液を100 μL/well分注した。

↓

発色反応　25℃　10分間静置した。

↓

反応停止　反応停止液100 μL/well分注した。

↓

測定（450nm）　　測定機：スマートリーダー

４．結果

4-1．1ロット目

表3-1　キットの保存安定性試験（1ロット目）

		保存日数			
		0	14	33	59
Bo	吸光度	1.512	1.444	1.464	1.415
	SD	0.025	0.027	0.025	0.035
	CV(%)	1.67	1.85	1.68	2.46
	相対値(%)※	100.0%	95.5%	96.8%	93.6%
標準品L	吸光度	1.287	1.290	1.313	1.367
	B/Bo	0.85	0.89	0.90	0.97
	SD	0.037	0.036	0.011	0.019
	CV(%)	2.9	2.8	0.9	1.4
	相対値(%)※※	100.0	102.7	102.0	108.9
標準品H	吸光度	0.335	0.317	0.310	0.369
	B/Bo	0.22	0.22	0.21	0.26
	SD	0.009	0.014	0.008	0.014
	CV(%)	2.8	4.5	2.5	3.7
	相対値(%)※※	100.0	99.2	95.7	117.8
Boｺﾝﾄﾛｰﾙ	吸光度	1.512	1.479	1.462	1.497
	SD	0.025	0.039	0.027	0.036
	CV(%)	1.7	2.6	1.9	2.4
	相対値(%)※	100.0	97.8	96.6	99.0
試験用試料	測定値	0.40	0.45	0.45	0.43
	変動率※※※		12.3%	12.0%	7.0%

4-2．2ロット目

表3-2　キットの保存安定性試験（2ロット目）

		保存日数			
		0	14	33	59
Bo	吸光度	1.486	1.525	1.436	1.561
	SD	0.062	0.013	0.033	0.021
	CV(%)	4.2	0.9	2.3	1.4
	相対値(%)※	100.0	102.6	96.6	105.0
標準品L	吸光度	1.259	1.430	1.320	1.346
	B/Bo	0.85	0.94	0.92	0.86
	SD	0.025	0.047	0.028	0.045
	CV(%)	2.0	3.3	2.1	3.3
	相対値(%)※※	100.0	103.1	102.3	96.9
標準品H	吸光度	0.311	0.350	0.332	0.395
	B/Bo	0.21	0.23	0.23	0.25
	SD	0.013	0.007	0.009	0.011
	CV(%)	4.1	1.9	2.8	2.7
	相対値(%)※※	100.0	104.6	102.3	109.4
Boｺﾝﾄﾛｰﾙ	吸光度	1.486	1.573	1.462	1.579
	SD	0.062	0.016	0.020	0.010
	CV(%)	4.2	1.0	1.4	0.6
	相対値(%)※	100.0	105.9	98.4	106.3
試験用試料	測定値	0.40	0.43	0.43	0.39
	変動率※※※		7.1%	9.5%	-2.8%

※　0日目の吸光度を基準とした相対値
※※　0日目のB/Boを基準とした相対値
※※※　0日目の測定値を基準とした変動率

５．考察

表3-1～2の通り、8℃保存59日経過で2ロットとも試料測定値の変動率は15%以内であり本キットは安定であった。なお本試験は続行中である。

資料　4

交差反応性（クロロタロニル）

１．目的
本キットの、類似構造農薬及び代表的農薬の交差反応性を確認した。
２．材料

対象農薬の標準品

1 クロロタロニル
2 フサライド
3 PCP
4 テクロフタラム
5 テトラジホン
6 シアゾファミド
7 シモキサニル
8 ベノミル
9 プロシミドン
10 オキサジキシル
11 イプロジオン
12 *cis*-ペルメトリン
13 *trans*-ペルメトリン
14 オキシン銅
15 アゾキシストロビン
16 メタラキシル

３．方法
3-1.交差反応性測定用試液の調製
標準品をメタノールで溶解して段階希釈し希釈列を調製した。
試験管に4 mLの10%メタノールをとり、希釈列を各試験管に40 μL添加して、
交差反応性測定用試液とした。

3-2.キットの調製
4℃保存キットを30分間25℃に静置した。
↓
酵素標識物試薬に精製水6 mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。

3-3.アッセイ
試験管に酵素標識物試液と交差反応性測定用試液を等量混合し、混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100 μL/well分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄3回実施した。
↓
発色液を100 μL/wellで分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止　　反応停止液100 μL/wellで分注した。
↓
測定（450nm）　　※測定機：スマートリーダー

3-4. 交差反応性の算出
測定結果からIC_{50}値を求めたのち、交差反応性を算出した。
計算式は以下のとおりである。

交差反応性（%）＝IC_{50}値（クロロタロニル）／IC_{50}値（対象農薬）×100

４.結果

表4　交差反応性一覧

農薬	交差反応性(%)
クロロタロニル	100
フサライド	38.7
PCP	1.7
テクロフタラム	＜0.1
テトラジホン	＜0.1
シアゾファミド	＜0.1
シモキサニル	＜0.1
ベノミル	＜0.1
プロシミドン	＜0.1
オキサジキシル	＜0.1
イプロジオン	＜0.1
cis-ペルメトリン	＜0.1
trans-ペルメトリン	＜0.1
オキシン銅	＜0.1
アゾキシストロビン	＜0.1
メタラキシル	＜0.1

５．考察

各種農薬に対する本キットの交差反応性は、表3に示す通りで、対象農薬のうちフサライドで38.7%、PCPで1.7%である以外は交差反応性は認めなかった。

資料　5

添加回収試験（クロロタロニル）

１．目的
農産物に添加したクロロタロニルの回収率を確認する。

２．材料
クロロタロニル測定キット
きゅうり
1000 ppm　標準品メタノール溶液

３．方法
3-1.添加用標準液の調製
1000 ppm　標準品メタノール溶液
↓
メタノールを用いて下記の表の様に添加用標準液を調製した。

添加用標準液の濃度

	A	B	C
標準液（ppm）	0.3	0.15	0.05

3-2.測定試液の調製
農産物試料
↓
磨砕：農産物を細断し、ミキサーでペースト状にした。
↓
ペースト5 ｇを 50 mL遠沈管×3個にそれぞれ正確に量りとった。
↓
添加用標準液をそれぞれ下記の表のように1 mLずつ添加した。
↓
↓　　添加用標準液の濃度およびサンプル中の農薬濃度
↓

添加試料	添加用標準液調製濃度	ホモジネート中農薬濃度	抽出・希釈後濃度	添加量
	ppm	ppm	ppb	mL
A	0.30	0.06	1.18	1.0
B	0.15	0.03	0.59	1.0
C	0.05	0.01	0.20	1.0

↓
↓
遠沈管のふたを閉め、よく振った。
↓
メタノール24mLを添加した。
↓
振とう機（110回/分)で30分間振とうした。
↓
綿球を詰めたシリンジでろ過した。
ろ液を標準品を添加した農産物抽出液(85%MeOH相当）とした。
↓
標準品を添加した農産物抽出液1 mLをﾊﾞｲｱﾙ瓶にとり、7.5 mLの蒸留水を添加し、
よく混和した。（8.5倍希釈）これを測定試液とした。

3-3.キットの調製
4℃で保管してある抗体プレート、酵素標識物試薬、
標準試薬を取り出し、30分間25℃に静置した。
↓
酵素標識物試薬に精製水6 mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。
標準試薬に10%メタノール　1.0 mLを添加、溶解して標準試液とした。

3-4.アッセイ
試験管に酵素標識物試液と測定試液、酵素標識物試液と標準試液及び酵素標識物試液と10%MeOHを等量混合して、混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100 μL/well分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄3回実施した。
↓
発色液を100 μL/wellで分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止　　反応停止液100 μL/wellで分注した。
↓
測定（450nm）　　測定機：スマートリーダー

４．結果

表5　添加回収試験

添加濃度　（ppm）	回収濃度(ppm)	回収率（%）	平均回収率（%）
0.06	0.05	90.1	98.8 ± 7.7
	0.06	101.3	
	0.06	104.9	
0.03	0.03	97.2	94.0 ± 2.8
	0.03	93.0	
	0.03	91.9	
0.01	0.01	106.9	109.4 ± 2.5
	0.01	111.9	
	0.01	109.3	

５．考察
きゅうりのペーストにクロロタロニルを添加した試料について、添加回収試験を行った。結果は表4のとお
回収率は94.0～109.4%と良好な値を示した。なお、回収率の計算は、下記のとおりである。
回収率（%）＝（添加試料の回収濃度）／（添加濃度）×100

付録３　取扱説明書

研究用試薬

スマートアッセイ シリーズ

クロロタロニル測定キットＥ

Ver.1

１．はじめに

本品は、従来の機器分析法とは全く異なる原理、抗クロロタロニル抗体の特異的反応を利用した酵素免疫測定法（Enzyme‐Linked Immunosorbent Assay；ELISA）によるクロロタロニルの測定キットです。測定に必要な全ての試薬をパッケージしており、煩雑な試薬調製の必要がなく、測定したい時にすぐにお使いいただけます。

２．　測定原理

本キットは、環境水中のクロロタロニルを直接競合ELISA法で測定するものです。

クロロタロニルと特異的に反応する抗体を固相化したマイクロプレートに、クロロタロニル（標準溶液または試料溶液）とクロロタロニル酵素標識物溶液の等量混合液を加えて競合反応させます。反応終了後、未反応物を洗浄除去し発色試薬を加えると、固相化抗体に結合した酵素標識物の酵素反応によって発色試薬中のテトラメチルベンジジンが酸化され、発色します。発色反応を発色停止試薬で停止させた後、450 nm の吸光度を測定します。吸光度は、標準溶液または試料溶液中のクロロタロニル濃度が高いほど低下します。標準溶液のクロロタロニル濃度とその吸光度の関係からクロロタロニル濃度を求めます。

３．　キットの特徴

1)**高感度**－クロロタロニルを 0.15～1.5 ppb の範囲で測定できます。
2)**簡　便**－機器分析法に比べ試料の煩雑な前処理を必要とせず、簡易な操作で測定できます。
3)**迅　速**－前処理が簡単なため、短時間で多くの試料を同時に測定できます。
4)**低コスト**－高価な機器を必要とせず、測定場所を特に選ばないため、コストを安くできます。

４．キットの構成

キットの構成は、第１表の通りです。

第１表　キットの構成

	品名	容量	剤型	数量
①	クロロタロニル抗体プレート	８ウエル×12 列 (96 ウエル)	乾燥品	１枚
②	クロロタロニル標準試薬Ｃ1（0.15 ppb）	1 mL	凍結乾燥品	２バイアル
③	クロロタロニル標準試薬Ｃ2（0.3 ppb）	1 mL	凍結乾燥品	２バイアル
④	クロロタロニル標準試薬Ｃ3（0.6 ppb）	1 mL	凍結乾燥品	２バイアル
⑤	クロロタロニル標準試薬Ｃ4（1.5 ppb）	1 mL	凍結乾燥品	２バイアル
⑥	クロロタロニル酵素標識物試薬	6 mL	凍結乾燥品	２バイアル
⑦	洗浄試薬(10 倍濃縮)	50 mL	液体	１バイアル
⑧	発色試薬	13 mL	液体	１バイアル
⑨	発色停止試薬	13 mL	液体	１バイアル
⑩	プレートシール			１枚

５．　測定に必要な試薬・器具・装置類

（１）試薬
①クロロタロニル測定キットＥ：ホリバ・バイオテクノロジー社製
②精製水
③メタノール：環境分析用
④10%メタノール：精製水を用いて 10 倍希釈

（２）器具
①マイクロピペット（50～200 μL,1000 μL）および専用チップ
②メスシリンダー：500 mL
③試験管：ガラス製、10 mL
④ガラス繊維フィルター（ADVANTEC 社製 GLASS FIBER FILTER GA-55 または同等品）

（３）装置
①ストップウォッチ：秒単位まで表示
②試験管ミキサー
③マイクロプレートリーダー：スマートリーダー (ホリバ・バイオテクノロジー社製)
④マイクロプレート洗浄機：スマートウォッシャー (ホリバ・バイオテクノロジー社製)

６．　溶液の調製

（１）クロロタロニル抗体プレート
そのまま用います。

（２）クロロタロニル標準溶液
クロロタロニル標準試薬Ｃ1、Ｃ2、Ｃ3 およびＣ4 に 10%メタノール１ mL をマイクロピペットで加えて溶解し、それぞれクロロタロニル標準溶液Ｃ１からＣ４とします。溶解後の濃度は、それぞれ 0.15、0.3、0.6 および 1.5 ppb です。

（３）クロロタロニル酵素標識物溶液
酵素標識物試薬に精製水 6 mL を加えて溶解し、クロロタロニル酵素標識物溶液とします。

（４）洗浄溶液
洗浄試薬に、精製水 450 mL をメスシリンダーで加えて希釈し、洗浄溶液とします。

（5）発色試薬
そのまま用います。
（6）発色停止試薬
そのまま用います。

7． 測定操作

1）測定方法

ろ　過
試料をガラス繊維フィルター等を用いてろ過し、メタノール 10%溶液を調製し、試料溶液とします。

混合液の調製
クロロタロニル標準溶液または試料溶液 150μL をマイクロピペットで試験管に取り、それぞれにクロロタロニル酵素標識物溶液 150μL をマイクロピペットで加えて混合し、標準混合液または試料混合液とします。

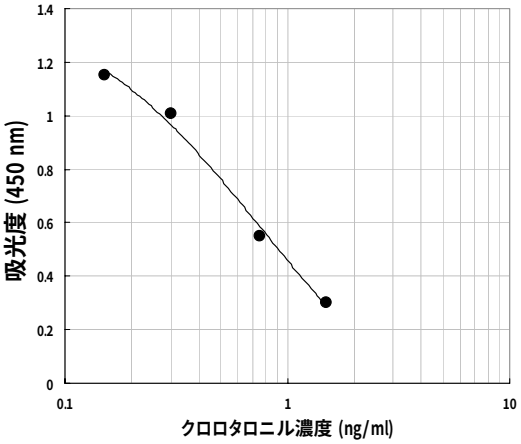
競合反応
抗体プレートのウェルに、標準混合液または試料混合液 100 μL ずつをマイクロピペット(50～200 μL 用)で分注します。ついで、ストリップの使用ウェルに合わせて切断したプレートシールを貼り、室温(15～25℃)で１時間反応させます。
※専用のマイクロプレートリーダー“スマートリーダー”を用いて測定を行う場合は、標準混合液の配置が決まっていますので、リーダーの取扱説明書に従って使用して下さい。

プレートの洗浄
反応液を吸引除去し、洗浄溶液 300 μL で 3 回洗浄します。
※ウェルの底に洗浄溶液が残っていないことを確認して下さい。
※測定の迅速性と定量精度を高めるため、専用の洗浄機のご使用をお勧めします。

発色反応、発色反応停止
マイクロピペット(50～200 μL 用)で発色試薬 100 μL を加えて室温(15～25℃)で 10 分間反応させた後、発色停止試薬 100 μL をマイクロピペット(50～200 μL 用)で添加して下さい。
※発色試薬を加えると時間と共に青色に、発色停止試薬を加えると瞬時に黄色に呈色します。
※各ウェルの発色反応時間が一定になるように注意して下さい。

吸光度測定
波長 450 nm における吸光度を、マイクロプレートリーダーにより測定します。
※発色停止後、１５分以内に吸光度を測定して下さい。
※専用のマイクロプレートリーダー“スマートリーダー”を使用いただくことにより、煩雑な濃度計算が自動的に行われます。

2）試料中のクロロタロニル濃度の計算
回帰式によって算出します。リーダーに付属している演算ソフト等により回帰式を求め、濃度を算出して下さい。式のＹに試料の吸光度を代入しクロロタロニル濃度（Ｘ）を求めることができます。専用のマイクロプレートリーダー“スマートリーダー”を用いて算出した回帰曲線と式を例として第１図に示します。



Y=-0.32+(1.46+0.32)/1+10^(logX-log0.78)

図１　回帰曲線および回帰式の例

8．他農薬との交差反応性

本キットに用いている抗体の各種農薬対する交差反応性は、第２表の通りです。

第２表　各種農薬との交差反応性

化合物名	代表的商品名	交差反応性(%)
クロロタロニル	ダコニール	100
フサライド	ラブサイド	38.7
PCP	登録失効	1.7
テクロフタラム	シハラゲン	＜0.1
テトラジホン	テデオン	＜0.1
シアゾファミド	ランマン	＜0.1
シモキサニル	（単剤なし）	＜0.1
ベノミル	ベンレート	＜0.1
プロシミドン	スミレックス	＜0.1
オキサジキシル	（単剤なし）	＜0.1
イプロジオン	ロブラール	＜0.1
cis 、trans-ペルメトリン	アディオン	＜0.1
オキシン銅	キノンドー	＜0.1
アゾキシストロビン	アミスター	＜0.1
メタラキシル	リドミル	＜0.1

9． 貯法・有効期間

貯　　法：遮光して 2～8℃に保存します。
有効期間：パッケージに表示してあります。

１０． 注意事項

使用前に、取扱説明書をよくお読みいただき、注意事項をお守りください。

1）一般的な注意事項

① 本キットは、食品衛生・環境等に関わる自主検査用です。測定結果の判断と運用は、すべてお客様自身の責任で行ってください。
② 責任ある管理者の指導のもとに、保護手袋、保護メガネ等を着用して安全に取り扱って下さい。
③ 吸飲したり、皮膚と接触したりすると有害な試薬類が含まれています。身体に異常を感じた場合は、直ちに医師の手当てを受けてください。

④ 保管・廃棄する場合には、衛生面、環境面に十分配慮し、法規を遵守してください。クロロタロニルを含む廃液、発色反応停止後の液（希硫酸を含む）は回収し、環境中に廃棄しないでください。
⑤ 本キットを一度に使い切らなかった場合は、各容器を密封し、取扱説明書と共に保管してください。

2）測定操作上の注意事項

① 本キットは、使用 30 分程前に冷蔵庫から取出し、室温に戻してからご使用ください。
② 異なるロットの試薬を組合わせて使用しないでください。
③ マイクロプレートは、各 8 ウェルづつのストリップタイプになっていますので、必要なウェル数のみを用意し、残りはラミネート袋に戻し、密封して冷蔵保存してください。また、抗体プレートを取扱う際は、裏面を汚さないようにしてください。
④ 正確な分析を行うため、試薬の溶解・希釈操作は可能な限り正確に行ってください。また、各反応時間を厳守してください。
⑤ 検量線は、測定ごとに作成してください。
⑥ 測定は少なくとも 2 重測定で行ってください。
⑦ 測定は、検量線範囲内の濃度（0.15 ～1.5 ppb）で行って下さい。1.5 ppb を超える高濃度の測定試料の場合は、10%メタノールで追加希釈した後再測定してください。
⑧ 競合反応後の洗浄ではウェルの底に洗浄溶液が残っていないことを確認して下さい。
⑨ 発色および発色停止反応時の各ウェルの反応時間が一定になるように調整してください。
⑩ 本キットは、フサライドと 38.7%の交差反応性がありますのでご注意ください。

株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
〒601－8315　京都市南区吉祥院車道町 48 番地
TEL.075－692－1786　FAX.075－692－1790
http://www.horiba-biotech.co.jp